

Stechele, Michael

Diss. München

1985

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. N. Zöllner

DIE LYSOSOMALE ENZYMAKTIVITÄT VON MONONUKLEÄREN ZELLEN
BEI PATIENTEN MIT ATHEROSKLEROTISCHEN GEFÄSSLEIDEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Michael Stechele

München

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. G. Wolfram

Mitberichterstatter: Prof. Dr. N. Zöllner

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 21. November 1985

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
1.1.	Atherosklerose und deren medizinische und volkswirtschaftliche Bedeutung	1
1.2.	Risikofaktoren der atherosklerotischen Gefäßleiden	2
1.3.	Theorien zur Pathogenese der Atherosklerose	8
1.4.	Lysosome - Bedeutung der Lysosome und der lysosomalen Enzyme in der Entstehung der Atherosklerose	10
1.5.	Fragestellung der Untersuchung	13
2.	Patienten, Material und Methoden	15
2.1.	Patienten	15
2.2.	Materialien	16
2.3.	Methoden	16
2.3.1.	Gewinnung mononukleärer Zellen	16
2.3.2.	Aktivitätsmessung der sauren Cholesterylester-Hydrolase	18
2.3.3.	Aktivitätsmessung der N-Azetyl- β -Glukosaminidase	20
2.3.4.	Eiweißbestimmung	20
3.	Ergebnisse	22
3.1.	Feststellung der optimalen Meßbedingungen	22
3.1.1.	Saure Cholesterylester-Hydrolase	22
3.1.2.	N-Acetyl- β -D-Glukosaminidase	22

3.2.	Übersicht über das gesamte Patientengut	22
3.3.	Durchschnittswerte und Standardabweichungen aller untersuchten Parameter	23
3.4.	Enzymaktivität der ACEH und NAGA	24
3.5.	Serumcholesterin- und Triglyzeridkonzentra- tion	25
3.6.	Korrelation zwischen Blutfetten und lysoso- malen Enzymaktivitäten	25
4.	Diskussion	26
5.	Zusammenfassung	36
6.	Tabellen und Abbildungen	38
7.	Literaturverzeichnis	53
8.	Anhang	63

1. Einleitung

1.1. Atherosklerose und deren medizinische und volkswirtschaftliche Bedeutung

Nach der Definition der WHO ist die Atherosklerose eine variable Kombination von Veränderungen der arteriellen Gefäßwand, die mit einer herdförmigen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, mit der Bildung eines fibrösen Gewebes und mit Kalkablagerungen einhergeht sowie mit Veränderungen der Media verbunden sein kann.

Die Atherosklerose, charakterisiert durch initiale Lipidablagerungen mit nachfolgender Proliferation glatter Muskelzellen mit Bildung von fibroblastischem Bindegewebe und nachfolgender Sklerose, kann - eben wegen ihrer pathogenetisch relevanten Lipideinlagerungen - als spezielle Form der Arteriosklerose verstanden werden, die durch chronische Umbauvorgänge im arteriellen Bereich mit Wandverhärtung, Elastizitätsverlust und Lumeneinengung gekennzeichnet ist.

Nach jahrelanger asymptomatischer Entwicklung der atherosklerotischen Gefäßverengung manifestieren sich klinische Folgeerscheinungen wie koronare Herzkrankheit (Angina pectoris, Herzinfarkt, akuter Herztod), zerebrovaskuläre Insuffizienz (Schlaganfall) und periphere arterielle Verschußkrankheiten (Claudicatio intermitens, Gangrän).

Diese Gefäßkrankheiten sind mit 31,3 % die führende Todesursache im mittleren Lebensalter und mit 42,5 % die häufigste Ursache für die Frühinvalidität in der BRD (57).

Für erwachsene Amerikaner steht die Atherosklerose mit ihren Folgekrankheiten an dritter Stelle bei den Ursachen von Morbidität und Mortalität überhaupt (21).

Aus der Häufigkeit der atherosklerotischen Angiopathien, der Altersverteilung und der Schwere der Erkrankung läßt sich die volkswirtschaftliche und sozialmedizinische Bedeutung ableiten: Etwa 18 % des Bundeshaushaltes und 4 % des Bruttosozialproduktes der BRD werden als Folgekosten atherosklerotischer Erkrankungen veranschlagt. Die jährlichen volkswirtschaftlichen Kosten und Verluste für Herz-Kreislauf-erkrankungen (ohne Berücksichtigung der Kosten und Verluste für frühzeitige Todesfälle) liegen bei 60 Milliarden DM (21): Diese setzen sich zusammen aus 8,5 Mrd. Behandlungskosten (ambulante und stationäre Leistungen, Arzneimittel, Krankengeld und Kuraufenthalte), 0,45 Mrd. Heilbehandlung, 0,05 Mrd. Berufsförderung, 8,5 Mrd. vorzeitige Rentengewährung und 40 Mrd. volkswirtschaftliche Verluste.

1.2. Risikofaktoren der atherosklerotischen Gefäßleiden

Ein Risikofaktor wird definiert als eine Variable, die in einer prospektiven Studie in statistisch-positiver Beziehung zu einer später auftretenden Krankheit steht, ohne aber deren Ursache sein zu müssen.

Zur Beurteilung des atherosklerotischen Risikos unterscheidet man Risikofaktoren erster und zweiter Ordnung.

Risikofaktoren erster Ordnung sind Hyper- und Dyslipoproteinämien, Hypertonie und Nikotinabusus. Diese kön-

nen, jeder für sich allein, klinische Komplikationen der atherosklerotischen Gefäßkrankheit bedingen.

Risikofaktoren zweiter Ordnung, zu denen z.B. Diabetes mellitus, Übergewicht und Bewegungsmangel gehören, bewirken im allgemeinen nur in Gemeinschaft mit einem oder mehreren anderen Faktoren klinische Komplikationen, weshalb sich auch die isolierte Betrachtung eines einzelnen Faktors verbietet. Bestehen nämlich gleichzeitig mehrere Risikofaktoren, so steigt die Inzidenz an kardiovaskulären Erkrankungen kumulativ an (38).

Ohne die Bedeutung anderer Risikofaktoren zu mindern, soll die enge Korrelation von Hypercholesterinämie und Atherosklerose besonders hervorgehoben werden. Ein Eckpfeiler dieser Betrachtungsweise ist die in verschiedenen epidemiologischen Studien gesicherte Korrelation zwischen dem Cholesterinspiegel und dem koronaren Krankheitsrisiko. Im sogenannten "Pooling Projekt", dem größten zur Verfügung stehenden Kollektiv, ist diese Beziehung im wesentlichen linear (22).

Die Framingham-Studie hat hingegen eindeutig ergeben, daß die individuelle Vorhersagekraft des Gesamt-Cholesterinspiegels bezüglich des koronaren Risikos sehr gering ist (38). Nur in Extrembereichen (< 160 mg/dl; > 320 mg/dl) ist der Gesamt-Cholesterinspiegel von prognostischer Bedeutung.

Desweiteren ergab sich aus dieser Studie, daß der durchschnittliche Cholesterinspiegel der Koronarkranken zwar höher ist, jedoch es sich für den Individualfall nicht vorhersagen läßt, ob eine Person am Ende eines gewissen Beobachtungszeitraumes der Gruppe der Koronargesunden oder der Gruppe der Koronarkranken zuzuordnen ist. Unberücksichtigt blieb bei diesen Untersuchungen jedoch die Tatsache, daß sich Low Density Lipoproteine

(LDL) und High Density Lipoproteine (HDL) in der Entwicklung der Atherosklerose gegensätzlich verhalten. Generell werden die LDL als ausschlaggebender Faktor für die Entstehung der atherosklerotischen Gefäßleiden betrachtet, während den HDL eher eine protektive Bedeutung zukommt.

In den Low Density Lipoproteinen (LDL-Cholesterin) werden 65-70 % des Gesamtcholesterins transportiert. Diese bestehen zu ca. 75 % aus Fetten (hauptsächlich Cholesterinester, Cholesterin, Phospholipide) und zu ca. 25 % aus Protein. Die positive Korrelation zwischen Atherosklerose und LDL-Cholesterinen ist durch mehrere Untersucher belegt worden.

So liefert die familiäre Hypercholesterinämie ein wesentliches Argument für die hohe Atherogenität des LDL-Cholesterins. Die massiv erhöhte LDL-Cholesterinkonzentration dieser Patienten führt bereits im jugendlichen Alter zu Gefäßverschlüssen und zu einer extrem hohen koronaren Morbidität.

Eine Untersuchung von SMITH und SLATER (55) zeigt die positive Korrelation zwischen Serumcholesterin und LDL-Cholesteringehalt der Intima menschlicher Arterien. Dieser Befund ist wiederholt bestätigt worden.

In der "Cooperative Lipoprotein Phenotyping Study" (17) bei 6859 Männern und Frauen aus mehreren Städten der USA konnte gezeigt werden, daß der LDL-Cholesterinspiegel positiv zum Koronarrisiko korreliert und daß bei gegebenem LDL-Cholesterinspiegel das Koronarrisiko durch die Höhe des HDL-Cholesterins modifiziert wird.

Ca. 25 % des Gesamtcholesterins im Blutserum ist Bestandteil der High Density Lipoproteine (HDL-Cholesterin). Im Gegensatz zum Risikofaktor LDL scheint HDL ein Schutz-

faktor der koronaren Herzkrankheit zu sein. HDL initiiert nämlich den Transport von Cholesterin aus der Zelle durch das Enzym Lecithin-Acyl-Transferase in die Leber, wo es abgebaut und durch die Galle ausgeschieden wird (12). Die antiatherogene Rolle der HDL ist durch zahlreiche epidemiologische und klinische Befunde belegt:

So betrug in der "Cooperative Lipoprotein Phenotyping Study" (17) (untersucht wurden 6859 Männer und Frauen im Alter über 40 Jahre) die Prävalenz der koronaren Herzkrankheit bei beiden Geschlechtern und in allen Altersgruppen 8 % bei Probanden mit einem HDL-Cholesterinspiegel von >45 mg/dl und 18 % bei Probanden mit einem HDL-Cholesterinspiegel <25 mg/dl. Die Beziehung war unabhängig von Plasmatriglyzerid- und LDL-Cholesterinspiegel des Blutserums.

Nach Untersuchungen von PEARSON et al. (45) haben Patienten mit einer Sklerose der linken Hauptkoronararterie die niedrigsten HDL-Cholesterinwerte. Zwischen der Zahl der atherosklerotisch befallenen Koronararterien und der HDL-Cholesterinkonzentration im Blutserum bestand eine negative Korrelation. Diese Zusammenhänge wurden bei beiden Geschlechtern und in beiden untersuchten Altersgruppen (30 bis 49 Jahre und 50 bis 70 Jahre) beobachtet.

Obwohl eine Vielzahl von Herzinfarktpatienten mäßig oder deutlich erhöhte Serumtriglyzeridspiegel aufweisen, ist die pathophysiologische Bedeutung einer isolierten Hypertriglyzeridämie hinsichtlich des Atheroskleroserisikos noch weitgehend unklar. Dies beruht einerseits darauf, daß eine Hypertriglyzeridämie auf Konzentrationserhöhungen verschiedener Lipoproteine mit unterschiedlicher atherogener Bedeutung reflektie-

ren kann (Chylomikronen, VLDL oder "remnants") und andererseits darauf, daß die Konzentrationserhöhung der triglyzeridreichen Lipoproteine das Ergebnis unterschiedlicher Störungen des Lipoproteinstoffwechsels ist, denen als solche eine unterschiedliche atherogene Bedeutung zukommt.

Zur Frage, ob und welche triglyzeridreichen Lipoproteine direkt oder indirekt eine Atherosklerose begünstigen bzw. induzieren, liegen widersprüchliche Ergebnisse aus epidemiologischen und klinischen Untersuchungen vor. Der Stellenwert der Triglyzeride als Risikofaktor der koronaren Herzkrankheit wird gegenwärtig kontrovers diskutiert (3, 14, 15, 16, 28, 39).

Epidemiologische und klinische Untersuchungen weisen jedoch auf eine mögliche Bedeutung der Hypertriglyzeridämie als Risikofaktor hin:

Eine eindeutige positive Beziehung zwischen Hypertriglyzeridämie und der Inzidenz der koronaren Herzkrankheit wurde in einer langjährigen prospektiven Studie in Stockholm beobachtet (8, 15, 16).

Eine in Finnland bei 50- bis 53-jährigen Männern durchgeführte prospektive Studie ergab, daß Serumtriglyzeride, Serumcholesterin und Zigarettenrauchen unabhängig voneinander mit der kardiovaskulären Mortalität assoziiert waren (46).

Die Kombination Hypertriglyzeridämie und Adipositas war mit dem höchsten Risiko hinsichtlich der kardiovaskulären Mortalität verbunden.

Auch in der Tromso-Studie wurden bei Patienten, die während einer 4-jährigen Beobachtungszeit einen Herzinfarkt erlitten, signifikant höhere Triglyzeridwerte als bei Kontrollpersonen ermittelt (43, 60).

Diese epidemiologischen und klinischen Hinweise konnten in anderen Untersuchungen nicht bestätigt werden:

Entsprechend den Ergebnissen der Framingham-Studie konnte nur bei 49- bis 85-jährigen weiblichen Probanden in der univariaten Analyse der Meßdaten eine Korrelation zwischen Hypertriglyzeridämie und der Inzidenz der koronaren Herzkrankheit nachgewiesen werden (27). Diese Korrelation war allerdings bei Berücksichtigung weiterer Risikofaktoren wie LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin, systolischer Blutdruck, relatives Körpergewicht, Diabetes mellitus oder EKG-Veränderungen nicht mehr zu beobachten.

Ebenso fanden WILHELMSEN et al. in einer in Göteborg durchgeführten Untersuchung bei 50-jährigen Männern und multivariater Auswertung der untersuchten Faktoren (u.a. Gesamtcholesterin, Triglyzeride, Rauchen, systolischer Blutdruck) keinen zusätzlichen Einfluß der Hypertriglyzeridämie auf die Inzidenz der koronaren Herzkrankheit (Herzinfarkt oder plötzlicher Herztod) (61).

In der "Cooperative Lipoprotein Phenotyping Study" wurde kein signifikanter Unterschied der Triglyzeridspiegel hinsichtlich des Vorkommens der Koronaren Herzkrankheit gefunden (17). Bei Einteilung der Triglyzeridwerte in drei Kategorien (< 89 mg/dl; $89-206$ mg/l; > 207 mg/dl) wurde hingegen in jeder Kategorie eine inverse Beziehung zwischen HDL-Cholesterin und der Häufigkeit der koronaren Herzkrankheit festgestellt.

Auch bei der Hyperlipidämie Typ IV (bei nephrotischem Syndrom und Hypothyreose) läßt sich die Atherogenität nicht sicher nachweisen.

1.3. Theorien zur Pathogenese der Atherosklerose

Morphologisch ist die Atherosklerose durch ein besonders formenreiches Erscheinungsspektrum gekennzeichnet. Entsprechend der Stadieneinteilung der Atherosklerose unterscheidet man die frühe, die fortgeschrittene und die komplizierte Läsion.

Bei der frühen Läsion kommt es zur Bildung von sogenannten Fettstreifen, gallertigen Erhebungen und Mikrothromben.

Die fortgeschrittene Läsion führt durch Fibrosen und Bildung von atherosklerotischen Plaques zu Atheromen.

Eine symptomatische Atherosklerose, wie Herzinfarkt, Gangrän oder Hirninfarkt, ergibt sich durch die fortgeschrittene Läsion ebenso wie durch auftretende Komplikationen wie Ulzerationen, Verkalkungen und Blutungen.

Die Interaktion unterschiedlich vorhandener Faktoren, wie allgemeine Gewebsalterung, rezidivierende Plättchenaggregation im Bereich von Endotheldefekten, Proliferation von Intima- und Mediazellen mit Faserbildung sowie pathologische Lipoproteininsudation der Arterienwand mit sogenannter Schaumzellbildung (siehe S. 11), ließ mehrere Theorien zur Zytogenese atherosklerotischer Läsionen entstehen.

a) Lipidtheorie (20)

Die Beteiligung der Plasmalipide (insbesondere Cholesterin) bzw. Plasmalipoproteinen (insbesondere BVLDL, LDL, HDL) an der Pathophysiologie der Atherosklerose läßt drei Vorgänge unterscheiden:

1. Vermehrter Transfer von Lipoproteinen aus dem Blut in die Arterienwand
2. zelluläre und extrazelluläre Akkumulation in der Arterienwand
3. verminderter Abtransport von Lipiden aus der Arterienwand.

b) "Response to Injury" Theorie (51)

Bei Schädigung der Endothelschicht von Blutgefäßen aggregieren Thrombozyten. Thrombozytäre Faktoren infiltrieren die Gefäßwand und verursachen so eine Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen, der Gefäßmedia.

c) Mesenchymale Theorie (unspezifische Mesenchymreaktion) (33, 34)

Die "Gefäßwandzelle" ist der entscheidendste Angriffspunkt für die "Risikofaktoren". Die Reaktion der Arterienwandzellen auf die Risikofaktoren ist der initiale und obligate Vorgang in der Entstehung der Atherosklerose. Der durch die Einwirkung der Risikofaktoren krankhaft veränderte Stoffwechsel der Arterienwandzellen (Mesenchymzellen) ist der eigentliche Krankheitsprozeß der Atherosklerose, analog dem veränderten Stoffwechsel der Synoviazellen (d.h. Mesenchymzellen) bei der rheumatischen Arthritis. Der pathologische Stoffwechsel der Arterienwandzellen bzw. der Synoviazellen, der kontinuierlich oder in Schüben - unterbrochen durch Remissionen - verlaufen kann, führt zu histologischen Wandveränderungen (Intimaödem, Hyalinose, Fibrose, Nekrose, Atheromatose, Thrombose).

d) Mutagene Theorie (Transformationstheorie) (6, 7)

Das Atherom entsteht analog einem gutartigen Tumor durch Proliferation einer einzelnen glatten Muskel-

zelle. Einzelne Zellen der Arterienwand werden durch Mutagene (z.B. Viren, karzinogene Stoffe) verändert und können bei Einwirkung von Risikofaktoren selektiv proliferieren.

e) Makrophagen-Theorie (37)

Außer Erythrozyten-Membrancholesterin und Membrancholesterin anderer Zellen (Leukozyten, Bakterien etc.) können diese Zellen unter physiologischen und pathologischen Umständen erhebliche Mengen an Plasmalipoproteinen aufnehmen und abbauen: der Cholesterinanteil der Plasmalipoproteine wird entweder verestert (Cholesterinoleat) und damit in der Zelle deponiert oder in die Extrazellulärflüssigkeit abgegeben. Es sind mehrere Rezeptorsysteme beschrieben worden, die eine spezifische Aufnahme von Lipoprotein - Cholesterin in die Zelle vermitteln und letztlich eine Cholesterinester - Deposition und Schaumzellbildung bewirken.

1.4. Lysosome - Bedeutung der Lysosome und der lysosomalen Enzyme in der Entstehung der Atherosklerose

Lysosome sind subzelluläre Organellen mit membrangebundener, polymorpher und zytoplasmatischer Struktur. Die physiologische Bedeutung der Lysosomen dürfte in der Beseitigung von Zellbestandteilen bei der "Zellmauserung" und im Abbau von höhermolekularen Verbindungen liegen, die durch Pinocytose aufgenommen wurden (32). So enthalten sie eine Vielzahl von hydrolytischen Enzymen, die Makromoleküle zu kleineren Bauteilen - wie z.B. Aminosäuren oder Fettsäuren abbauen können, welche dann erst in der Lage sind, die lysosomale Membran zu durchwandern. Durch die ACEH werden die aus dem LDL freige-

setzten Cholesterinester hydrolisiert, nachdem LDL durch Pinocytose in das Lysosom aufgenommen wurde. Das so freigesetzte Cholesterin kann zum endoplasmatischen Reticulum gelangen, wo es die endogene Cholesterinsynthese, die Bildung von neuen LDL-Rezeptoren und wahrscheinlich auch die weitere Hydrolyse gespeicherter Cholesterinester hemmt (11).

Die Lysosomen und deren Enzyme wurden in den letzten Jahren eingehender auf ihre Bedeutung für die Atherosklerose untersucht.

So entdeckten DE DUVE et al. (19) bei der Untersuchung atheromatös veränderter Aorten von Kaninchen, die einer cholesterinreichen Fütterung ausgesetzt waren, daß die Aktivität verschiedener lysosomaler Hydrolasen mit zunehmendem Schweregrad der Atherosklerose wesentlich höher war als normal und die Lysosomen gleichzeitig eine zunehmend geringere physikalische Dichte aufwiesen.

Als Substanzen von niedriger Dichte kommen nur Lipide in Betracht, die in den Zellen akkumulieren und zwar vornehmlich Cholesterin und seine Ester. HALEY und seine Mitarbeiter (31) bestätigten diese Ergebnisse und identifizierten derartige Zellen morphologisch als Schaumzellen. Eine Untersuchung solcher Zellen zeigte das Vorkommen sowohl membrangebundener lysosomaler als auch freier zytoplasmatischer Lipidtropfen. Mittels morphometrischer Techniken konnten SHIO et al. (53) nachweisen, daß sich annähernd 60 % aller Lipidablagerungen in Schaumzellen von Kaninchenaorten in den Lysosomen befanden. Bei Rhesusaffen, denen eine aus 40 % Fett bestehende Diät verabreicht wurde, die mit der Ernährung der meisten Amerikaner konform geht, fand WOLINSKI (62) nach 6-8 Monaten neben einem

erhöhten Serumcholesterinspiegel eine erhöhte Aktivität der lysosomalen Funktion, saure Phosphatase und N-Acethyl- β -D-Glukosaminidase (NAGA), die proportional war zu den morphologischen Veränderungen der Atherosklerose.

In einer Studie an 23 menschlichen Brusttaorten mit Atherosklerose fand man erwartungsgemäß ebenfalls eine Anreicherung von Cholesterin und seinen Estern in den Zellen der erkrankten Regionen. Auffällig war dabei die Beobachtung, daß die spezifischen Aktivitäten verschiedener lysosomaler Enzyme, einschließlich der sauren ACEH, signifikant größer in erkranktem Gewebe als in gesundem Gewebe war (24).

All diese Beobachtungen lassen erkennen, daß die lysosomale Stimulation ein Merkmal experimenteller und auch spontaner Atherosklerose - auch schon im Frühstadium - ist, und daß das Lysosom einen bedeutenden "Speicher" für Cholesterin und Cholesterinester darstellt. Die Mechanismen, die zu diesen Ergebnissen führen, sind weitgehend unbekannt. Neben einigen anderen Theorien zu dieser Problematik besteht die von DE DUVE (19), die im wesentlichen besagt, daß eine Lipidanreicherung auf einen relativen Mangel des cholesterinspaltenden Enzyms ACEH in den Lysosomen zurückzuführen ist. Zwar ist nach DE DUVE die absolute Enzymaktivität erhöht, aber sie steht nicht im richtigen Verhältnis zum gestiegenen LDL-Einstrom in die Zelle und ist somit in der Relation immer noch zu gering. Diese Mißbalance könnte über Jahre hinweg zunächst zur Schaumzellbildung und später zu einer massiven extrazellulären Fettdeposition führen, wobei das Fett von defekten Zellen stammt.

Der Theorie DE DUVE'S gegenüber stehen Aussagen neuerer Arbeiten, denen absoluter Mangel an der lysosomalen Enzymaktivität zugrunde zu liegen scheint.

YATSU et al. (63) untersuchten die lysosomale Enzymaktivität der ACEH von mononukleären Zellen bei 11 Patienten mit transitorisch ischämischen Attacken als Ausdruck einer symptomatischen Atherosklerose und verglichen sie mit einem gesunden Kontrollkollektiv. Das Ergebnis war eine signifikant niedrigere Enzymaktivität bei den Patienten mit transitorisch ischämischen Attacken.

RAVI SUBBIAH et al. (48) untersuchten die ACEH-Aktivitäten in Aorten von Tauben, die 3 Monate zuvor einer Ileum-Bypass-Operation unterzogen wurden und verglichen diese Werte mit denen von Tauben, die nicht behandelt wurden. Das Ergebnis war eine wesentlich weniger ausgeprägte Atherosklerose und höhere Enzymaktivitäten der ACEH. Ohne Zweifel kann daraus gefolgert werden, daß in den Lysosomen von Zellen mit aktiver Atherosklerose die Aktivität von ACEH zu niedrig gewesen sein muß.

Zum selben Schluß führte eine Untersuchung von SLOEN und FREDERICH (54) an einer jungen Frau mit angeborenem Enzymdefekt der ACEH. Bei fehlender Aktivität war ein exzessiv progredienter Verlauf der Atherosklerose zu registrieren.

1.5. Fragestellung der Untersuchung

Bei der Entstehung der Atherosklerose könnte die vermehrte Speicherung von Cholesterin und seinen Estern eine wesentliche Bedeutung haben. Während es relativ

sicher erscheint, daß dies mit einem verminderten Abbau dieser Stoffe in den Lysosomen zusammenhängt, führen alle Beobachtungen und Messungen bezüglich einer lysosomalen Stimulation als Kennzeichen der experimentellen und spontanen Atherosklerose derzeit zu keinen übereinstimmenden Ergebnissen. Inwiefern nun die lysosomale Enzymaktivität von Patienten mit symptomatischer Atherosklerose gegenüber einem Kontrollkollektiv unter Bedingungen, die der "in vivo" Situation sehr nahe kommen, verändert ist, wurde zur Fragestellung dieser Arbeit.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob Veränderungen der ACEH isoliert für dieses Enzym zu sehen sind oder ob die Ergebnisse eher im Sinne des gesamten Lysosomenenzymkomplexes zu interpretieren sind, wurde bei allen Untersuchungen zusätzlich die NAGA, ein polysaccharidspaltendes lysosomales Enzym mitbestimmt. Verglichen wurden zwei Gruppen von Patienten mit symptomatischer Atherosklerose mit einer Gruppe, die von keiner Gefäßkrankheit betroffen war.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Patienten

Für die Untersuchungen der lysosomalen Enzyme von mononukleären Zellen wurde venöses Blut von 39 Patienten der Poliklinik München entnommen, die alle auf internistischen Abteilungen stationär behandelt wurden. Bei 13 dieser Patienten war eine koronare Herzkrankheit diagnostiziert worden, bei 15 eine arterielle Verschußkrankheit und bei 13 Patienten eine andere, nicht zum atherosklerotischen Formenkreis gehörende Krankheit; diese Gruppe diente als Kontrollkollektiv. Bei der Auswahl der Patienten wurde darauf geachtet, daß außer einer Hyperlipidämie keine weiteren Stoffwechselstörungen vorlagen, welche die lysosomalen Enzyme beeinflussen hätten können.

2.2. Materialien

Cholesteryl 1-¹⁴C-Oleat und 1-¹⁴C-Ölsäure stammten von New England Nuclear (Boston, Mass.). Triton-X-100 war von Merck (Darmstadt). Segma Chemical (St. Louis, Mo.) lieferte Cholesteryl-Oleat, Behring (Marburg) Rinder-Serum-Albumin und Serva Feinbiochemica (Heidelberg) lieferte Lecithin aus Eigelb sowie 4-Methylumbelliferon. 4-Methylbelliferyl-2-Acetymido-2-Desoxy-β-D-Glucopyranosid kam von Paesel (Frankfurt), Na-Taurocholat stammt von der Fa. Carl Roth (Karlsruhe). GIBCO (Grand Island, NY) stellte Hank's balanced Salt Solution bereit. Ficoll-Trennlösung und RPMI 1640 medium kamen von Seromed (Berlin).

Im eigenen Labor hergestellt wurden PBS (40 g NaCl, 1 g KCl, 5,75, Na₂HPO₄·2H₂O, 1 g KH₂PO₄, in 5l Muldestor gelöst) und Bray-Solution (40 Nephtalin, 4 g PPO-Packard, 0,2 POPOP-Packard, 20 ml Ethylenglykol, 100 ml Ethanol, mit Dioxin auf 1l aufgefüllt).

2.3. Methoden

2.3.1. Gewinnung mononukleärer Zellen

Periphere mononukleäre Zellen wurden aus venösem Blut, das am Morgen von einem Probanden abgenommen und mit 10 I.E. Heparin/ml versetzt wurde, nach der Methode von BOYÜM (9), modifiziert von HO u.a. (37), frisch isoliert.

Dabei wurden zunächst 15 ml Ficoll'sche Lösung in konische 50 ml Polypropylenröhrchen transferiert und vorsichtig mit je 20 ml Blut überschichtet. Anschließend wurde 40 Minuten lang bei 1500 rpm in einer Haereus Christ Labofuge 2 (Haereus Christ, Osterode/Harz) zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation waren die Blutzellen in 2 Fraktionen geteilt: Die eine wurde gebildet durch einen milchig trüben Ring, aus mononukleären Zellen und Thrombozyten bestehend, der die Grenze zwischen Serum und Ficoll'scher Lösung darstellte, die andere durch ein Sediment aus Erythrozyten und Granulozyten am Boden des Röhrchens. Die Interphase von ca. 5 ml wurde nun mittels einer Pasteurpipette in ein neues 50 ml-Röhrchen transferiert und mit 30 ml Hank's Medium gut vermischt.

Anschließend wurden die Zellen in einer Fuchs Rosenthal Zählkammer gezählt. Der Mittelwert aus 4x16 ausgezählten Kleinstquadranten x5000x ml Hank's Medium ergab die gesuchte Zellzahl.

Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 1500 rpm, wobei sich die Monozyten absetzten, wurde der Überstand verworfen und das Sediment in der gewünschten Menge Zellextraktlösung (hier 2×10^6 Zellen/ml) aufgelöst. Diese Zellextraktlösung setzte sich aus 0,25 Sucrose (MG 342,3; 42,5 g/500 ml Muldestor), 1 MEDTA (MG 372; 186 ml/500 ml Muldestor), das 0,1 % (V,V) Ethanol enthielt und Triton -x- 100 (0,1 %; V,V) zusammen. Durch Einwirkung der Zellextraktlösung - in Zusammenhang mit der anschließenden Tiefgefrierung - wurden die Zellmembranen zerstört, die Zellenzyme freigesetzt und somit für die Messungen zugänglich gemacht.

Nach sorgfältigem Mischen füllte man den Zellextrakt

in 1 ml Eppendorf-Röhrchen ab und fror sie bis zur Weiterverwendung bei -70°C ein.

2.3.2. Aktivitätsmessung der sauren Cholesterylester-Hydrolase (ACEH)

Die saure ACEH in mononukleären Zellen wurde hauptsächlich nach der Methode bestimmt, die schon bei anderen Zelltypen benutzt wurde (59).

Für die Herstellung von 1 ml Substrat wurden in einem spitzzulaufenden Reagenzglas Cholesteryl-1- ^{14}C -Oleat 1 μCi , 10 μmol Cholesteryl-Oleat und 0,8 μmol Lecithin aus Eigelb in Benzol vermischt und in Stickstoff getrocknet. Na-Taurocholat (0,25 von 2,4 mmol/l) wurde hinzugefügt und die Mischung eisgekühlt mit dem Mikrotip eines Branson Sonifier B12 (Branson Sonic Power Corp., Danbury, Conn.) für 4x20 Sekunden auf Stufe 5 beschallt. Daraufhin gab man 0,25 ml Rinderseerum Albumin (200 $\mu\text{g/ml}$) und 0,2 mol/l Na, Acetat Puffer, pH 4,0, hinzu und mischte sorgfältig. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 100 μl Zellextrakt zu 100 ml Substrat in chloroformfesten Reagenzgläsern gestartet. Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten bei 37°C . Die Reaktion wurde gestoppt, indem man die Reagenzgläser aus dem Wasserbad in Eis stellte und 3,25 ml Extraktionslösung (Chloroform-Methanol-Heptan, 1,25:1,41:1), 1 ml 0,5 molaren Na-Carbonat-Bicarbonat-Puffer pH 10,5, sowie 30 μl molare NaOH zugab. Nach sorgfältigem Mischen und 15-minütigem Zentrifugieren bei 800 g und 4°C wurde 1 ml der oberen Phase

in Scintillations-Fläschchen pipettiert und in 10 ml Bray in einem Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer, Modell 544 (Packard Instrument, Downers Grove, Ill.) jeweils 10 Minuten lang gezählt. Eine Lösung einer radioaktiven markierten Ölsäure wurde als interner Standard benutzt.

Sämtliche Messungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Das Ergebnis errechnete sich zu $\mu\text{mol/Stunde/mg Protein}$ Enzymaktivität. Hierzu waren folgende Rechenschritte notwendig:

1. Extrakt %:
$$\frac{\text{cpm } \ddot{O}_{\text{ex}} \times 2,4}{\text{cpm } (\ddot{O} \text{ total})} \times 100$$
2. $(\text{cpm Probe} - \text{cpm Leerwert}) \times 2,4 = \text{total cpm}$
3.
$$\frac{\text{Total cpm} \times 100 \times 2}{\% \text{ Extrakt} \times 3} = \text{total korrigierte cpm}$$

(bei 90 min. Inkubationszeit)
4.
$$\text{total cor. cpm} \times \frac{27,3 \mu\text{mol (eingesetztes Substrat)}}{\text{Substrat cpm}} =$$

$\mu\text{mol/h}$
5.
$$\frac{\mu\text{mol/h}}{\text{mg Proteinkonzentration}} = \mu\text{mol/h/mg Protein}$$

Legende: cpm = counts pro minute

$\ddot{O}_{\text{ex}}$ = extrahierte Ölsäure

$\ddot{O} \text{ total}$ = C^{14} Ölsäure in Lösung

Substrat = eingesetzte Menge Oleat in Lösung

2.3.3. Aktivitätsmessung der N-Azetyl- β -Glukosaminidase

Für die Messung dieses Enzyms wurde die fluorimetrische Methode von PETERS et al. (47), modifiziert von FOWLER et al. (24), verwendet unter Anpassung an mononukleäre Zellen.

0,1 ml Zellextrakt wurde 60 Minuten lang bei 37°C mit 0,1 ml (0,2 M) 4-Methylumbelliferyl-2-Acetamidol-desoxy- β -D-glukosamid (MUG) in 0,25 mol/l Sucrose, die 0,1 mol/l Acetatpuffer pH 5,7 enthielt, inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von 2 ml 50 mM NaOH-Glycinpuffer pH 10,5, der 5 mmol/l EDTA enthielt.

Das freigesetzte 4-Methylumbelliferon wurde am Fluorimeter Eppendorf (Nether + Heinz, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 366 nm (Excitation) und 440 nm (Emission) gemessen. Passende Enzym- und Substrat-Leerwerte wurden hergestellt. Standardkurven erhielt man, indem man 4-Methylumbelliferon im dazugehörigen Puffer mit 3 ml NaOH-Glycinpuffer vermischte und den Fluoreszenzbetrag wie oben beschrieben maß.

2.3.4. Eiweißbestimmung

Die Lowry-Reaktion zur Proteinbestimmung (42) ist eine Erweiterung der Biuretmethode. Der im ersten Schritt gebildete Kupfer-Protein-Komplex reduziert ein Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Reagens (Folin-Ciocolteau-Phenol-Reagens), wobei eine intensiv blaue Färbung entsteht.

Das Protein in Zellextrakten wird nach der Methode ohne TCA-Fällung bestimmt.

Zunächst wurden die hierfür erforderlichen Lösungen hergestellt.

Lösung A: 10 % Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH;

Lösung B: 0,0122 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 0,0244 % Na-K-Tartrat.

Für Lösung C vermischte man 41 ml Lösung B mit 10 ml Lösung A unmittelbar vor der Proteinbestimmung.

Für den Standard (1 mg Protein/ml 0,1 NaOH) vermischte man jeweils 20,50 und 100 μl Albumin mit 100 μl Zellextraktlösung und füllte die Reagenzgläser mit 0,1 NaOH auf 500 μl auf. Die Proben bestanden aus jeweils 100 μl Zellextrakt und 400 μl 0,1 N NaOH, die Leerwerte entsprechend aus 100 μl Zellextraktlösung und 400 μl 0,1 N NaOH. Alle Werte liefen als Doppelbestimmungen. Im 30-Sekundentakt setzte man nun jeweils 1000 μl Lösung C hinzu. Nach genau 10 Minuten wurden- wiederum im 30-Sekundentakt - 100 μl Folinreagens hinzugefügt. Anschließend wurde 30 Minuten gewartet, um dann mit der Messung der Extinktion am Spektral-Photometer (Perkin-Elmer, Überlingen) bei 750 nm.

Mittels Standardextinktion-Leerwert errechnete man den Mittelwert für 100 μg Albumin. Die gesuchten Proteinmengen ergaben sich dann aus der Formel:

$$\frac{E(\text{Probe}) - E(\text{Leerwert})}{E(100 \mu\text{g Albumin})} \times 100 = \mu\text{g Albumin im eingesetzten Volumen Zellextrakt}$$

3. Ergebnisse

3.1. Feststellung der optimalen Meßbedingungen

3.1.1. Saure Cholesterylester-Hydrolase (ACEH)

Die Aktivität der ACEH war bis zu einer Proteinkonzentration von 20 µg im Meßansatz linear (Abb. 1). Bei dieser Eiweißkonzentration waren 0,6 % der Cholesterylester hydrolysiert. Die Zeitabhängigkeit ergab eine Linearität bis 120 Minuten, das ph-Optimum war 4,0. Im neutralen ph-Bereich war keine Aktivität meßbar. Die Hydrolyse des Substrates zeigte mit steigender Substratkonzentration Sättigung.

3.1.2. N-Acetyl-β-D-Glukosaminidase (NAGA)

Für die Messung der NAGA-Aktivität wurden folgende optimalen Meßbedingungen ermittelt:

Linearität mindestens bis zu einer Eiweißkonzentration von 6 µg Protein, Zeitabhängigkeit bis 60 Minuten, ph-Optimum 5,6 (Abb. 2).

3.2. Übersicht über das gesamte Patientengut

Tab. 1 zeigt alle untersuchten Patienten in alphabetischer Reihenfolge. Zugeordnet wurden jeweils die einzelnen Parameter Geschlecht, Alter, Diagnose, Serumcholesterinwert, Triglyzeridwert und Enzymaktivität der ACEH und NAGA.

Das Patientengut bestand aus 13 Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit, 15 mit einer arteriellen Verschußkrankheit und 13 mit einer anderen, nicht zum atherosklerotischen Formenkreis gehörenden Krankheit. Gesichert war die Diagnose der koronaren Herzkrankheit durch die klinische Symptomatik, durch EKG, durch Belastungs-EKG und zum Teil durch eine Koronarangiographie. Die arterielle Verschußkrankheit, Stadium II b und III, war stets durch eine Angiographie bestätigt.

Es wurde geprüft, ob ein geschlechtsspezifischer Unterschied in den lysosomalen Enzymaktivitäten vorliegt und gegebenenfalls einer statistischen Prüfung standhalten kann. Es stellte sich heraus, daß kein Unterschied in den Enzymaktivitäten bei Frauen und Männern besteht.

3.3. Durchschnittswerte und Standardabweichungen der untersuchten Parameter

In Tab. 2 wurden die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die statistische Signifikanz aller gemessenen Parameter zusammengestellt.

Für die ACEH ergab sich mit 6,2 nmol/mg/h Protein ein signifikant niedrigerer Durchschnittswert bei den Patienten mit arterieller Verschußkrankheit gegenüber der Kontrollgruppe mit 8,01 nmol/mg/h Protein. Die Gruppe mit koronarer Herzkrankheit ließ mit 6,36 nmol/mg/h Protein lediglich eine Tendenz zur Erniedrigung der Enzymaktivität gegenüber der Kontrollgruppe erkennen.

Die NAGA war bei beiden Gruppen mit symptomatischer Atherosklerose signifikant erniedrigt.

Die Serumtriglyzeridwerte waren nur bei den Patienten mit arterieller Verschußkrankheit signifikant erhöht, wogegen das Serumcholesterin wieder in beiden Gruppen signifikant erhöht war gegenüber dem Kontrollkollektiv.

3.4. Enzymaktivität der ACEH und NAGA

In den Abb. 3 und 4 werden Einzel- und Mittelwerte der Enzymaktivitäten von ACEH und NAGA bei unterschiedlichem Krankheitsbild verglichen. Dabei wird deutlich, daß die lysosomalen Enzymaktivitäten der Gruppe, die von keinem atherosklerotischen Gefäßleiden betroffen war, sowohl wesentlich höhere Durchschnitts-, als auch den erkrankten Gruppen gegenüber nach oben verschobene Spitzenwerte aufwies.

Statistisch signifikant erniedrigt waren die gemessenen Enzymaktivitätsveränderungen der NAGA bei beiden Patientengruppen mit symptomatischer Atherosklerose. Die Aktivität der ACEH war nur bei Patienten mit arterieller Verschußkrankheit signifikant erniedrigt; bei den Patienten mit koronarer Herzkrankheit waren die Durchschnittswerte der ACEH ebenfalls deutlich erniedrigt, wiesen aber keine statistisch signifikanten Veränderungen auf.

3.5. Serumcholesterin- und Triglyzeridkonzentration

Die Abb. 5 und 6 zeigen die unterschiedlichen Serumlipidkonzentrationen der drei überprüften Gruppen. Die Werte wurden dem Krankenblatt der jeweiligen Patienten entnommen und waren aus dem Nüchternserum ermittelt worden.

Statistisch signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe waren die Cholesterinwerte beider Gruppen mit symptomatischer Atherosklerose, während die Triglyzeridwerte nur bei den Patienten mit arterieller Verschlußkrankheit signifikant erhöht waren (Tab. 2).

3.6. Korrelation zwischen Blutfetten und lysosomalen Enzymaktivitäten

In den Abb. 7-12 wurde geprüft, ob sich zwischen einzelnen Enzymaktivitäten bzw. Serumlipidwerten eine statistische Korrelation feststellen läßt. Es zeigt sich, daß lediglich zwischen der ACEH und NAGA untereinander eine statistisch signifikante Korrelation besteht; alle anderen Parameter stehen in keiner Abhängigkeit voneinander.

4. Diskussion

Die anatomischen Veränderungen der Atherosklerose sind gekennzeichnet durch ausgedehnte Verfettungen (Atheromherde) einerseits und durch Verdickung und Verhärtung (Sklerosierung) der Gefäßwand andererseits. Verfettung, Bindegewebswucherung, Nekrose und Verkalkung sind oft in der mannigfaltigsten Weise kombiniert. Ein wegen seiner obliterierenden Wirkung wesentliches Teilphänomen der Atherosklerose ist die Atherombildung. Nachdem die Atheromentstehung lange Zeit vorwiegend auf eine lokale Proliferation von glatten Muskelzellen bezogen wurde, ergeben sich aus neueren Untersuchungen Hinweise auf eine wesentliche Beteiligung von Makrophagen.

Makrophagen vermögen verschiedene Lipoproteine über Rezeptoren und den Weg der Phagozytose in einem Umfang aufzunehmen, der schließlich zu einer kritischen Cholesterinesterakkumulation ("Schaumzelle"), zum Zelltod und damit zur Entstehung eines nekrotischen Atheromzentrums führt.

Lange war die Herkunft solcher Makrophagen nicht geklärt. GERRITY et al. (25) zeigten, daß die mononukleären Zellen in atherosklerotischen Läsionen eindeutig von Monozyten aus dem zirkulierenden Blut stammen, welche in die Gefäßintima vom Gefäßlumen her eindringen. Ferner konnte er beweisen, daß diese Monozyten, die durch Peroxidase identifiziert wurden, ihre Phagozytentätigkeit in dem Moment aufnehmen, in dem der erste Lipidtropfen in ihrem Zytoplasma auftritt. Letztlich führte dies zur Annahme, daß die Monozyten der Ursprung von Schaumzellen in frühen atherosklerotischen Läsionen sind.

Den Lysosomen, deren Aufgabe die Beseitigung von degene-

rierten Zellbestandteilen ist, wird das von den Makrophagen aufgenommene Material zugeführt. Sie enthalten saure Hydrolasen, die dazu dienen, die ihnen zugeführten Stoffe zu Bausteinen, wie z.B. Amino- und Fettsäuren abzubauen und dem Zellstoffwechsel zur Verfügung zu stellen (18). Auch die von der Zelle aufgenommenen cholesterin- und triglyzeridreichen Lipoproteine werden den Lysosomen zugeführt und dort hydrolisiert. Lysosomen haben eine Membran und können durch Ultrazentrifugation von Zellhomogenaten isoliert werden. Die Aktivitäten der lysosomalen Enzyme wurden in diesen Homogenaten gemessen.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, die zellulären Membranen durch Detergentien, osmotischen Schock oder Beschallung zu zerstören. Im Homogenat kann wegen des charakteristischen pH-Optimums die Enzymaktivität der lysosomalen Enzyme ebenso bestimmt werden.

Diese Methode haben wir gewählt. Frisch isolierte mononukleäre Zellen wurden zur Präparation herangezogen, weil sie wohl am ehesten - gegenüber präpariertem Aortenmaterial zum Beispiel - die in vivo-Situation wiedergeben.

Bestimmt wurden die beiden lysosomalen Enzyme:
N-Azetyl-Beta-D-Glukosaminodase (NAGA) und
saure Cholesterylester-Hydrolase (ACEH).

Die ACEH spaltet die Fettsäuren der Cholesterinester. Auch ist sie für den Abbau von Lipoproteinen mitverantwortlich, während die NAGA terminale Residuen in Glykoproteinen hydrolisiert und deshalb an obigen Prozessen nicht beteiligt ist. Die Ergebnisse der optimalen Meßbedingungen stimmten mit denen anderer Untersucher gut überein, die diese Enzyme in anderen Zellarten gemes-

sen hatten. Auch die Höhe der gemessenen Enzymaktivitäten von mononukleären Zellen konnten ebenso gut mit früheren Untersuchern in Einklang gebracht werden, wie der fehlende geschlechtsspezifische Unterschied der Enzymaktivität, der bei den vorliegenden Auswertungen festgestellt wurde (63, 64, 30).

Es ist noch nicht geklärt, durch welchen Mechanismus die Lysosomen in der Entstehung der Atherosklerose von Bedeutung sind. DE DUVE und Mitarbeiter (19) fanden, daß bei experimenteller Atherosklerose zunächst eine Steigerung einiger lysosomaler Enzymaktivitäten von Rattenaorten zu verzeichnen war, später jedoch bei länger bestehender Atherosklerose die Aktivitäten vermindert waren. Er stellte die Theorie auf, daß die Lipidakkumulation die Folge einer funktionellen Verminderung der sauren Cholesterylesterase und anderer lysosomaler Hydrolasen sei, die nicht in der Lage sind, sich einem erhöhten Einstrom lipidreicher Lipoproteine effektiv anzupassen. Dieser Mechanismus könnte dann im Laufe von Jahren zur Bildung einer Zellverfettung und einer atheromatösen Schaumzelle führen.

BRECHER et al. (10) fanden eine um das 2,5-fach erhöhte lysosomale Enzymaktivität in atherosklerotischen Kaninchenaorten gegenüber Kontrolluntersuchungen und räumte deshalb ein, daß die lysosomale ACEH kein limitierender Faktor in der Atherogenese ist. Er stellte die Möglichkeit in den Raum, daß Cholesterin durch das Enzym Cholesterolacyl-transferase (ACAT) verestert wird und so die Cholesterinesterakkumulation zustandekommt. Tatsächlich wurden in atherosklerotischen Kaninchenaorten erhöhte ACAT-Aktivitäten gefunden. Demnach würden die vermehrten Cholesterinester in Schaumzellen eher von einer erhöhten intrazellulären Synthese herrühren als

aus einem relativen Defizit der esterspaltenden ACEH.

Diese Theorien werden allerdings nur teilweise durch genetisch bedingte Stoffwechselkrankheiten belegt. SLOAN und FREDRICKSON (54) beschrieben eine Frau mit genetisch bedingtem Mangel an saurer Cholesterylester-Hydrolase, die schon in jungem Alter von einer schweren Atherosklerose befallen war. Einige Patienten mit dieser Erkrankung zeigten jedoch keine deutlich vermehrte Atherosklerose (41).

Dieselben Ergebnisse konnte RIDDL (50) für die Cholesterylester storage disease (CESD) aufzeigen.

Ebenso einen absoluten Mangel an lysosomaler Enzymaktivität in mononukleären Zellen fand YATSU (63) und stellte alternativ zu DE DUVE'S Theorie die Möglichkeit zur Diskussion, daß die verminderte lysosomale Aktivität ein sekundärer Effekt der erhöhten intrazellulären Cholesterinesterkonzentration im Sinne eines negativen Feed back Mechanismus ist.

Gut belegt sind die Veränderungen der zellulären lysosomalen Enzymaktivitäten bei Diabetes mellitus. Die spezifischen Aktivitäten von sauren Hydrolasen in der Aorta von Streptozotocin induzierten diabetischen Ratten ist deutlich erniedrigt (62 a bzw. 63). Interessant war in diesem Zusammenhang, daß die ACEH negativ mit der Konzentration von cholesterinreichen Lipoproteinp Partikeln im Serum korrelierte. Nach Insulintherapie konnten die Enzymaktivitäten normalisiert werden.

Bei Patienten mit Diabetes mellitus konnte durch Insulintherapie die Aktivität von ACEH und NAGA in frisch isolierten mononukleären Zellen gesteigert werden (35).

Gestützt auf epidemiologische Untersuchungen, klinische und biochemische Befunde sowie tierexperimentelle Studien besteht an der Rolle des Cholesterin in der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit kein Zweifel. Im sogenannten "Pooling Projekt" (22) der American Heart Association wird die Beziehung Cholesterin-Atherosklerose eindeutig untermauert; es wird weitgehend die Ansicht vertreten, daß die koronare Herzkrankheit unter 160 mg/dl Gesamtcholesterin selten vorkommt, und daß mit 220 mg/dl ein Schwellenwert erreicht wird, jenseits dessen das relative Krankheitsrisiko linear ansteigt. Allerdings hat die Framinghamstudie ergeben, daß die individuelle Vorhersagekraft des Cholesterinspiegel bezüglich des koronaren Risikos sehr gering ist. Nur in Extrembereichen (< 160 mg/dl; > 320 mg/dl) ist der Gesamtcholesterinspiegel von prognostischer Bedeutung (A 18).

High Density Lipoproteine (HDL) und Low Density Lipoproteine (LDL) zeigen in der Entwicklung der Atherosklerose ein konträres Verhalten. Während HDL den Transport von Cholesterin aus der Zelle initiiert und somit einen Schutzfaktor gegen Atherosklerose darstellt, wird eine Konzentrationserhöhung von LDL-Cholesterin als obligat atherogen betrachtet (4).

In der vorliegenden Studie wurden LDL- und HDL-Werte nicht untersucht. Daß die zusätzliche Kenntnis des HDL-Cholesterins die individuelle Voraussagekraft eines Krankheitsrisikos verbessern könnte, verspricht eine Berechnung von EPPSTEIN (23), die besagt, daß ein hohes Gesamtcholesterin (> 270 mg/dl) kombiniert mit einem niedrigen HDL-Cholesterin (< 40 mg/dl) mit einem 6mal höheren Risiko einhergeht als ein niedriges Gesamtcholesterin (< 220 mg/dl) kombiniert mit hohem HDL-Cholesterin (> 50 mg/dl).

Die Resultate der vorliegenden Untersuchungen zeigen entsprechend dem "Pooling Projekt", daß die Patienten mit symptomatischer Atherosklerose signifikant höhere Durchschnittswerte für das Gesamtcholesterin aufweisen als die Kontrollgruppe (Tab. 2, Abb. 5). Versucht man aber die Einzelwerte des Cholesterin mit denen der lysosomalen Enzyme als "Index für Atherosklerose" gegenüberzustellen, so zeigt sich, daß keinerlei Beziehung der Werte zueinander vorliegt, was mit den Ergebnissen der Framingham-Studie in Einklang zu bringen ist.

Demgegenüber stehen Ergebnisse aus einer Studie an frisch isolierten mononukleären Zellen von HAGEMENAS (30), der eine signifikant erniedrigte ACEH und signifikant erhöhte Cholesterinesterwerte bei Patienten mit Hypercholesterinämie II fand. Obwohl in dieser Studie sowohl die heterozygote familiäre Hypercholesterinämie als auch die erworbene Hypercholesterinämie enthalten waren, wurde auch keinerlei Unterschied zwischen diesen Gruppen bei anderen bestimmten Laborparametern gefunden. Dies läßt vermuten, daß die verminderte ACEH-Aktivität nicht einfach eine Konsequenz der verminderten LDL-Rezeptorenzahl ist, wie es für die familiäre Hypercholesterinämie bekannt ist (26). Ob diese Ergebnisse einen primären oder sekundären Effekt der angestiegenen Lipidkonzentration darstellen, bleibt zu eruieren.

Ungeklärt ist derzeit noch die Bedeutung der Triglyzeride an der Atherogenese. Epidemiologische Untersuchungen führen zu konträren Ergebnissen; ihre Interpretation wird zusätzlich dadurch erschwert, daß

ein erhöhter Triglyzerid- bzw. VLDL-Triglyzerid-Spiegel in aller Regel nicht isoliert vorkommt, sondern von anderen koronaren Risikofaktoren begleitet ist.

Auch mit den hier vorliegenden Ergebnissen und deren Auswertungen können keine neuen Argumente in die kontroverse Diskussion über den Zusammenhang der Serumtriglyzeride und Atherogenese eingebracht werden.

Ähnlich dem Resultat bei den Cholesterinwerten findet sich keine Korrelation zwischen lysosomalen Enzymen und Triglyzeriden (Abb. 9 und 10), obwohl die Durchschnittswerte innerhalb der drei untersuchten Gruppen deutlich differieren (Abb. 6, Tab. 2).

Eine weitere interessante Perspektive bildet die Ansicht, daß die lysosomalen Enzyme einer hormonellen Steuerung unterliegen, zumindest durch Hormone in ihrer Aktivität beeinflußt werden können.

So verglichen YATSU et al. (64) die lysosomale Enzymaktivität zwischen Frauen, die orale Kontrazeptiva einnehmen mit einer Kontrollgruppe während eines Zyklus. Sie fanden heraus, daß bei Frauen während Kontrazeptivaeinnahme die signifikante Fluktuation der ACEH-Werte ausblieb, die bei der Kontrollgruppe zu beobachten war. Ebenso wenig waren Unterschiede der ACEH während vier Wochen bei Männern zu messen. Ferner wurden in jeder Gruppe gleichbleibende Serumcholesterinwerte während eines Zyklus registriert, die absoluten Werte lagen jedoch bei der Gruppe unter oraler Kontrazeption signifikant höher. Berück-

sichtigt man hierzu noch, daß orale Kontrazeptiva einnehmende Frauen häufiger an früher Atherosklerose leiden als andere Frauen (44, 56), drängt sich der Zusammenhang zwischen Atherosklerose, Risikofaktor, hormoneller Steuerung und lysosomaler Enzymaktivität auf.

Da während hormoneller Kontrazeption zum Teil die hypophysäre Hormonausschüttung supprimiert ist, lassen die erniedrigten ACEH-Werte daran denken, daß sie einer hypophysären Steuerung unterliegen könnten. Dies wurde z. B. auch aus Versuchen an hypophysektomierten Tieren geschlossen, die bei einer verminderten ACEH-Aktivität in steroidproduzierendem Gewebe eine signifikante Vermehrung von Cholesterinester zum Resultat hatten (2, 29).

Hypothyreoidismus zieht einen Abfall des LDL-Katabolismus nach sich, der durch die Gabe von Schilddrüsenhormonen verhindert werden kann (58). SEVERSON (52) verabreichte thyreoidektomierten Ratten Schilddrüsenhormone und konnte zeigen, daß dabei die ACEH in Leber, Niere und epididymidalen Fettpolstern (nicht allerdings am Herzen) signifikant anstieg. Diese Resultate ließen WOLINSKI (61) folgern, daß die Stimulation der ACEH durch Schilddrüsenhormone an einen erhöhten LDL-Katabolismus geheftet ist und so den hypocholesterinämischen Effekt ausmacht. SEVERSON (52) fand aber, daß die Behandlung seiner thyreoidektomierten Ratten mit Östrogenen, die bekanntermaßen den LDL-Katabolismus fördern, keinen Einfluß auf die ACEH hatte und schloß daraus, daß der ACEH-Anstieg infolge von Schilddrüsenhormonen kein sekundärer Ef-

fekt ist infolge des gestiegenen LDL-Umsatzes, sondern ein Einfluß der ACEH per se vorliegen muß. Andere Forscher haben jedoch gezeigt, daß menschliche glatte Muskelzellen, die einem LDL-Medium ausgesetzt wurden, weit mehr Cholesterinester aufnehmen, als ein ACEH-Mangel dies per se bewirken könnte (1).

Daß auch bei der genannten Schilddrüsenveränderung die Hypophyse als vorgeschaltetes Organ einen gewissen Anteil haben könnte, bleibt derzeit eine unbelagte Hypothese.

Auch neuere unveröffentlichte Untersuchungen von HENZE deuten auf einen hormonabhängigen Regelmechanismus der lysosomalen Enzyme hin.

Die Resultate der vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß die lysosomale Enzymaktivität bei Patienten mit symptomatischer Atherosklerose absolut vermindert ist gegenüber einem Kontrollkollektiv. Obwohl bei der Gruppe mit koronarer Herzkrankheit keine signifikanten Veränderungen der ACEH vorhanden waren und solche bei der Gruppe mit arterieller Verschußkrankheit gerade erreicht wurde, läßt sich eine hohe Korrelation nachweisen zwischen ACEH und NAGA (Abb. 7), wobei für letztere stets signifikante Änderungen gemessen wurden. Ob größere Kollektive notwendig sind, um eindeutiger Ergebnisse zu erzielen oder ob die lysosomalen Enzyme auf periphere Arterien tatsächlich einen größeren Einfluß haben, muß eine offene Frage bleiben.

Ob ein genetischer Schaden der Atherosklerose zugrundeliegt, wie es bei der Wollmann'schen Erkrankung der Fall ist, kann mit dieser Arbeit ebenso wenig ausge-

geschlossen werden wie eine hormonelle Steuerung der lysosomalen Enzymaktivität. Hingegen ist es ausgeschlossen, daß die Blutfette Cholesterin und Triglyzeride die Ursache für die verminderte lysosomale Enzymaktivität sind.

Es ließ sich nämlich keine Korrelation zwischen den lysosomalen Enzymen und den Blutfetten herstellen, obwohl die Mittelwerte von Cholesterin und Triglyzeriden gegenüber den Kontrollgruppen ebenso verändert waren wie die Durchschnittswerte der ACEH und NAGA. Zu diskutieren bleibt auch, inwieweit eine verminderte Lysosomenanzahl bei normaler oder gar erhöhter Enzymaktivität Schuld an symptomatischer Atherosklerose tragen kann. Um aufzudecken, inwiefern eine reduzierte mononukleäre ACEH-Aktivität bereits vor dem Auftreten der symptomatischen Atherosklerose vorhanden ist, bedarf ebenfalls weiterer Studien.'

Die profund erniedrigten ACEH-Werte in der Wollmann'schen Erkrankung und bei der Cholesterinester-Speicherkrankheit (CESD) mit bewiesener Atherosklerose lassen in Verbund mit den Ergebnissen von YATSU (63), SUBBIAH (48) und den hier vorliegenden Resultaten die Theorie möglich werden, die einem absoluten Mangel an ACEH-Aktivität eine wichtige Rolle in der Entstehung der Atherosklerose zuschreibt.

5. Zusammenfassung

Die Cholesterinesterakkumulation in der Arterienwand stellt einen wichtigen Teilprozeß der Atherosklerose dar. Die Mechanismen, die zu der dadurch bedingten schaumzellartigen Verfettung führen, sind weitgehend unbekannt. Eine inadäquate lysosomale Enzymaktivität könnte hierbei eine entscheidende Rolle spielen.

In dieser Untersuchung wurden von 39 Patienten die lysosomalen Enzymaktivitäten der N-Azetyl- β -Glukosaminidase (EC Nr. 3.2.1.30) und der sauren Cholesterylesterhydrolase (EC Nr. 3.1.1.31) in isolierten Monozyten bestimmt, nachdem für diese Enzyme die optimalen Meßbedingungen ermittelt waren. Miteinbezogen in die Auswertung wurden die Serumcholesterin- und Serumtriglyzeridwerte der Patienten, von denen 13 von einer koronaren Herzkrankheit, 15 von einer arteriellen Verschußkrankheit und 13 von einer nicht zum arteriosklerotischen Formenkreis gehörenden Krankheit befallen waren.

Es zeigte sich, daß bei den an symptomatischer Atherosklerose erkrankten Patienten jeweils wesentlich geringere Durchschnittswerte an lysosomaler Enzymaktivität vorlagen als bei dem Kontrollkollektiv. Besonders deutlich war dies bei den Patienten mit peripherer Verschußkrankheit. Obwohl bei dem Kontrollkollektiv auch niedrigere Durchschnittswerte für Serumcholesterin und Serumtriglyzeride vorlagen, war bei den einzelnen Patienten keine Korrelation zwischen lysosomaler Enzymaktivität und Blutfettwerten zu eruieren.

Diese Resultate lassen die Schlußfolgerung zu, daß eine verminderte lysosomale Enzymaktivität für die Cholesterinesterakkumulation in der Arterienwand und somit für die Atherogenese mitverantwortlich sein könnte.

Tabelle 1: Übersicht über das gesamte Patientengut

Patient	Geschl.	Alter	Diagn.	Chol.	Tri.	ACEH	NAGA
A.	ml.	66	K.	243	196	5,4	53,4
A.	ml.	60	K.	211	112	13,7	50,5
B.	w.	46	K.	256	77	8,3	47,4
B.	ml.	76	AV	261	244	6,4	36,1
B.	ml.	70	AV	302	157	3,4	35,3
D.	ml.	67	AV	230	169	4,3	24,1
E.	w.	70	KH	274	94	10,0	38,5
F.	ml.	61	AV	182	134	5,6	34,9
F.	ml.	57	AV	248	176	7,2	45,3
G.	w.	58	KH	291	87	6,6	45,7
H.	w.	55	KH	200	147	4,9	44,3
H.	w.	75	AV	320	300	9,5	61,0
J.	ml.	46	K.	214	163	8,2	48,7
J.	ml.	58	KH	214	134	6,3	60,6
K.	w.	58	K.	160	60	11,9	54,8
K.	ml.	45	K.	193	104	6,4	36,3
K.	w.	57	KH	299	189	10,6	49,3
K.	w.	31	K.	178	81	9,0	50,0
K.	ml.	45	AV	229	66	5,3	28,6
K.	ml.	46	K.	189	143	5,1	35,3
L.	ml.	61	AV	285	127	5,2	44,5
L.	ml.	53	KH	200	72	7,3	40,3
N.	w.	52	KH	201	139	6,3	43,3
N.	ml.	30	K.	180	107	2,2	53,4
P.	w.	67	AV	320	120	4,7	33,5
P.	ml.	42	K.	203	115	8,4	68,1
P.	w.	75	KH	275	75	9,3	43,2
R.	w.	67	AV	296	102	1,6	28,9
R.	w.	60	KH	320	80	4,5	24,9

Patient	Geschl.	Alter	Diagn.	Chol.	Tri.	ACEH	NAGA
S.	w.	72	KH	224	211	3,1	33,7
S.	ml.	59	AV	257	163	9,8	42,3
S.	ml.	29	K.	169	97	8,1	55,0
V.	ml.	49	AV	288	355	11,9	68,9
W.	w.	53	K.	181	89	6,3	45,8
W.	w.	46	KH	182	148	3,3	14,7
W.	w.	73	AV	337	215	5,9	47,4
W.	w.	53	AV/KH	202	250	2,9	28,9
Z.	ml.	52	K.	208	183	11,3	74,0

Legende:

- w. = weiblich
- ml. = männlich
- KH = koronare Herzkrankheit
- K. = Kontrollgruppe
- AV = Arterielle Verschußkrankheit
- Chol. = Cholesterin (mg/dl)
- Tri. = Triglyzeride (mg/dl)
- ACEH = saure Cholesterylester-Hydrolase (nmol/h/mg P)
- NAGA = N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (nmol/h/ml Protein)

Tabelle 2: Durchschnittswerte und Standardabweichungen
der untersuchten Parameter von den 3 Gruppen

	KHK	Kontrolle	AVK
ACEH	6,36 $\pm$ 2,56	8,01 $\pm$ 3,08	6,2 $\pm$ 2,86 X
NAGA	40,6 $\pm$ 12,1 X	51,7 $\pm$ 10,6	40,2 $\pm$ 10,2 X
Cholesterin	244 $\pm$ 46,2 X	198 $\pm$ 27,8	268 $\pm$ 48,8 X
Triglyzeride	141 $\pm$ 57,1	117 $\pm$ 41,8	176 $\pm$ 82,2 X

X === Statistische Signifikanz 0,05

Alle anderen Vergleiche zeigten keine Signifikanz

Legende:

ACEH = saure Cholesterylester-Hydrolase (nmol/h/mg Protein)
NAGA = N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (nmol/h/ml Protein)
Cholesterin = mg/dl
Triglyzeride = mg/dl
KHK = koronare Herzkrankheit
AVK = arterielle Verschußkrankheit

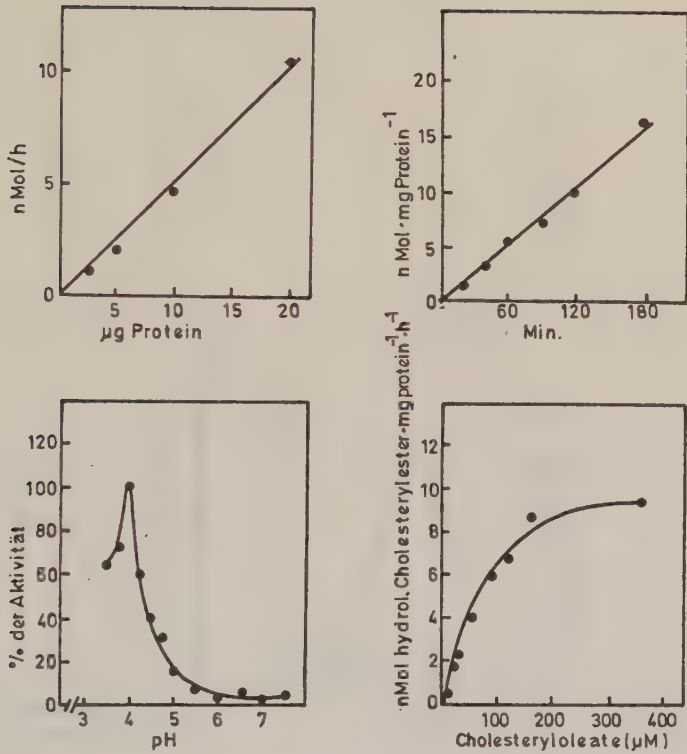


Abb. 1: Bestimmung der optimalen Meßbedingungen für die Aktivität der lysosomalen Sauren Cholesteryl-ester-Hydrolase in Monozyten-Makrophagen

- A) Abhängigkeit vom zellären Protein
- B) Zeitabhängigkeit
- C) ph-Optimum
- D) Abhängigkeit von der Substratkonzentration

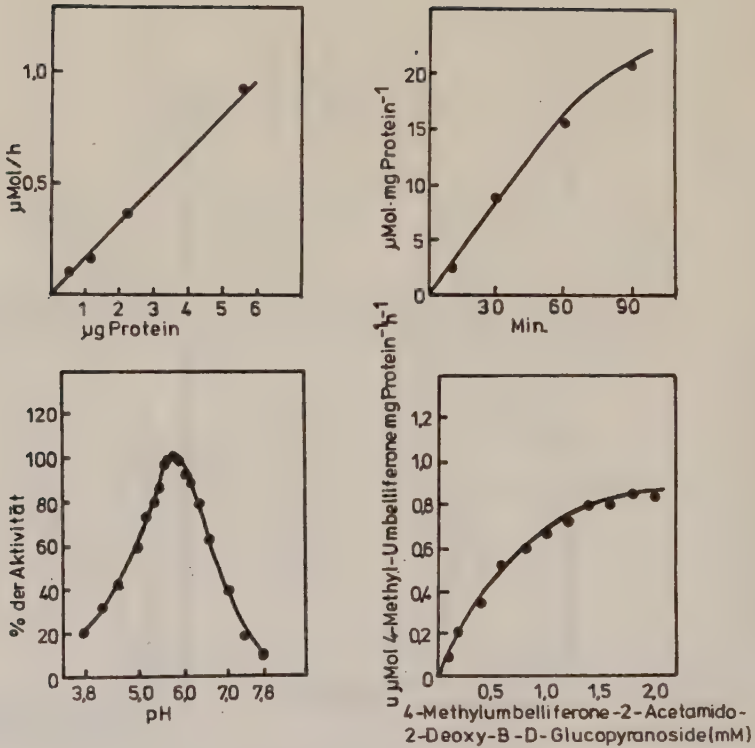


Abb. 2: Bestimmung der optimalen Meßbedingungen für die Aktivität der lysosomalen N-Azetyl-β-D-Glukosaminidase in Monozyten-Makrophagen

- A) Abhängigkeit vom zellulären Protein
- B) Zeitabhängigkeit
- C) pH-Optimum
- D) Abhängigkeit von der Substratkonzentration

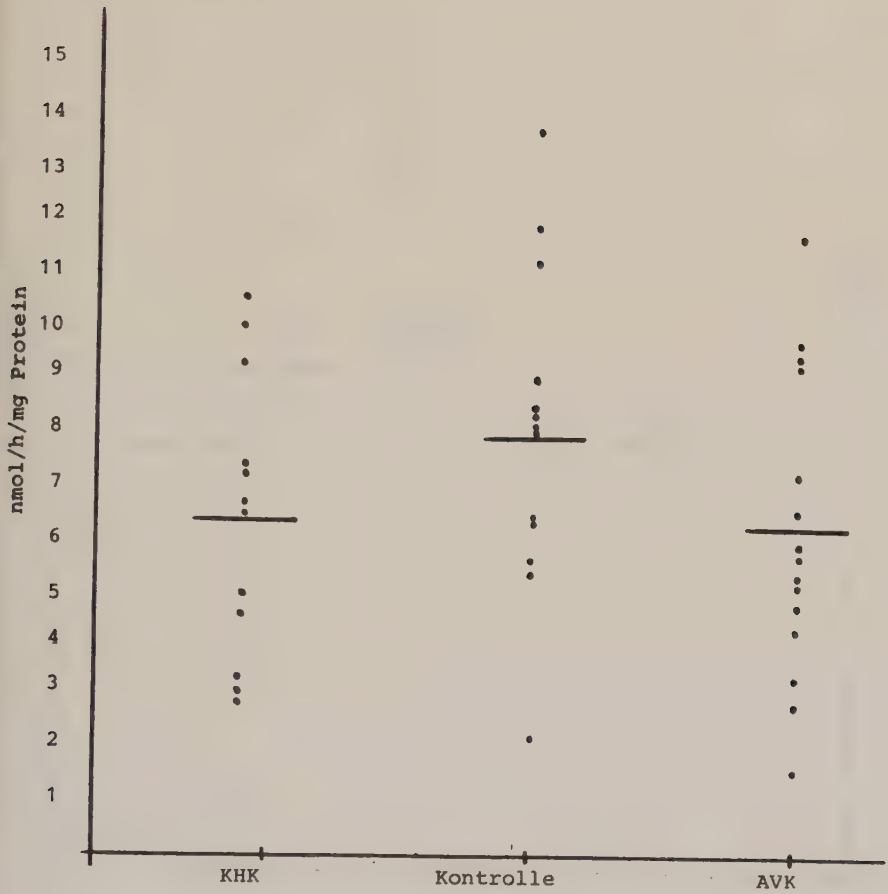


Abb. 3: Einzel- und Mittelwerte der ACEH der einzelnen Gruppen

Legende: KHK = Koronare Herzkrankheit

AVK = Arterielle Verschußkrankheit

ACEH = Saure Cholesterylester-Hydrolase
(nmol/h/mg Protein)

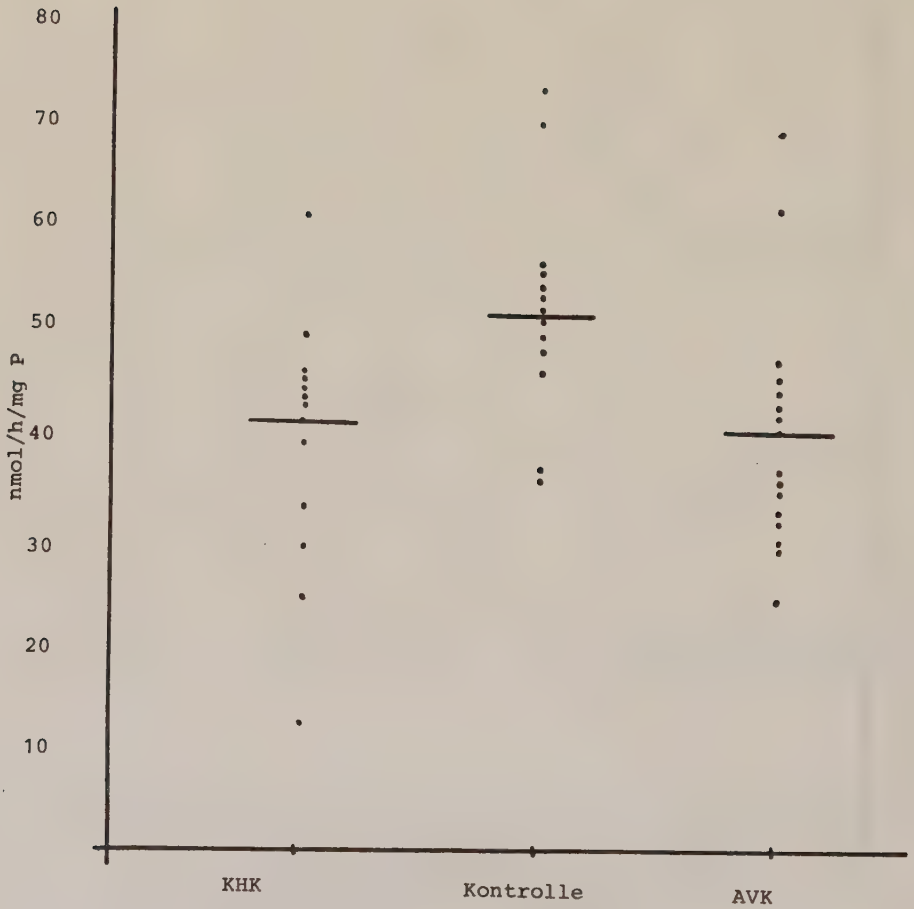


Abb. 4: Einzel- und Mittelwerte der NAGA der einzelnen Gruppen

Legende: NAGA = N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase
(nmol/h/mg Protein)

KHK = Koronare Herzkrankheit

AVK = Arterielle Verschußkrankheit

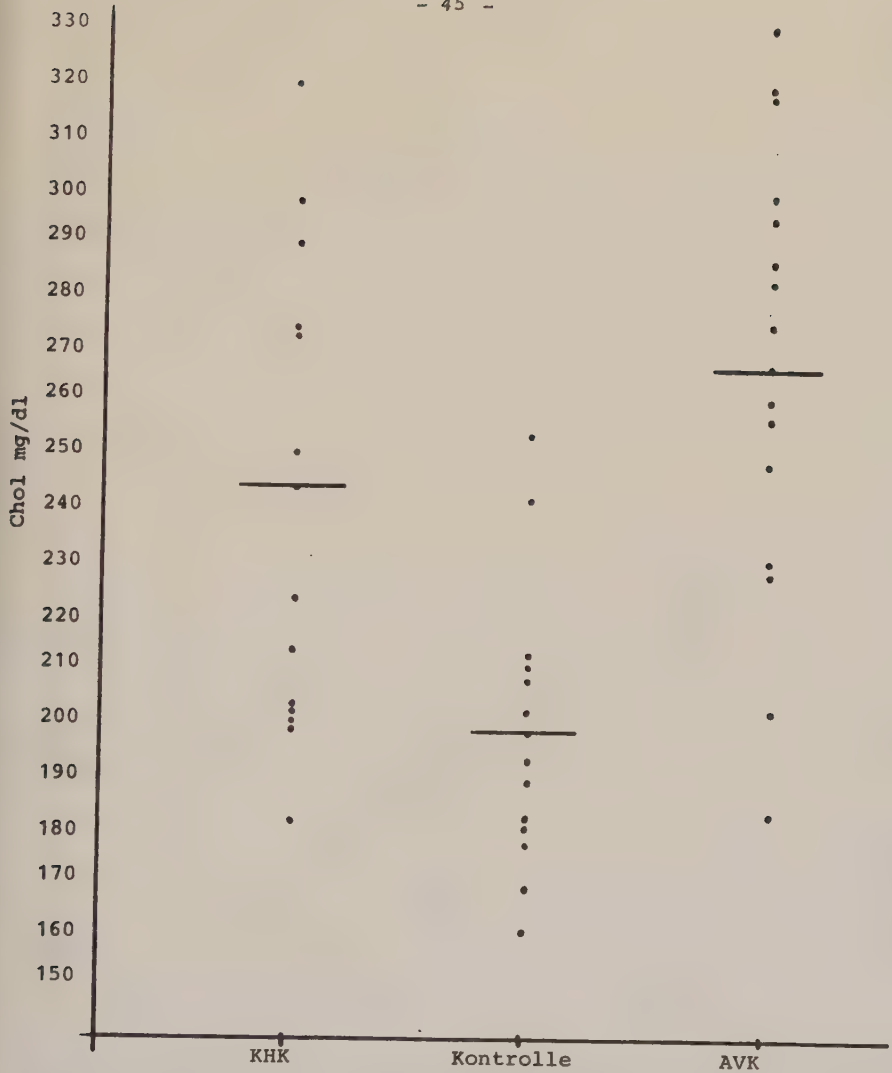


Abb. 5: Vergleich der Serumcholesterinspiegel unter den 3 Gruppen
Einzel- und Durchschnittswerte

Legende: Chol = Cholesterin (mg/dl)

KHK = Koronare Herzkrankheit

AVK = Arterielle Verschußkrankheit

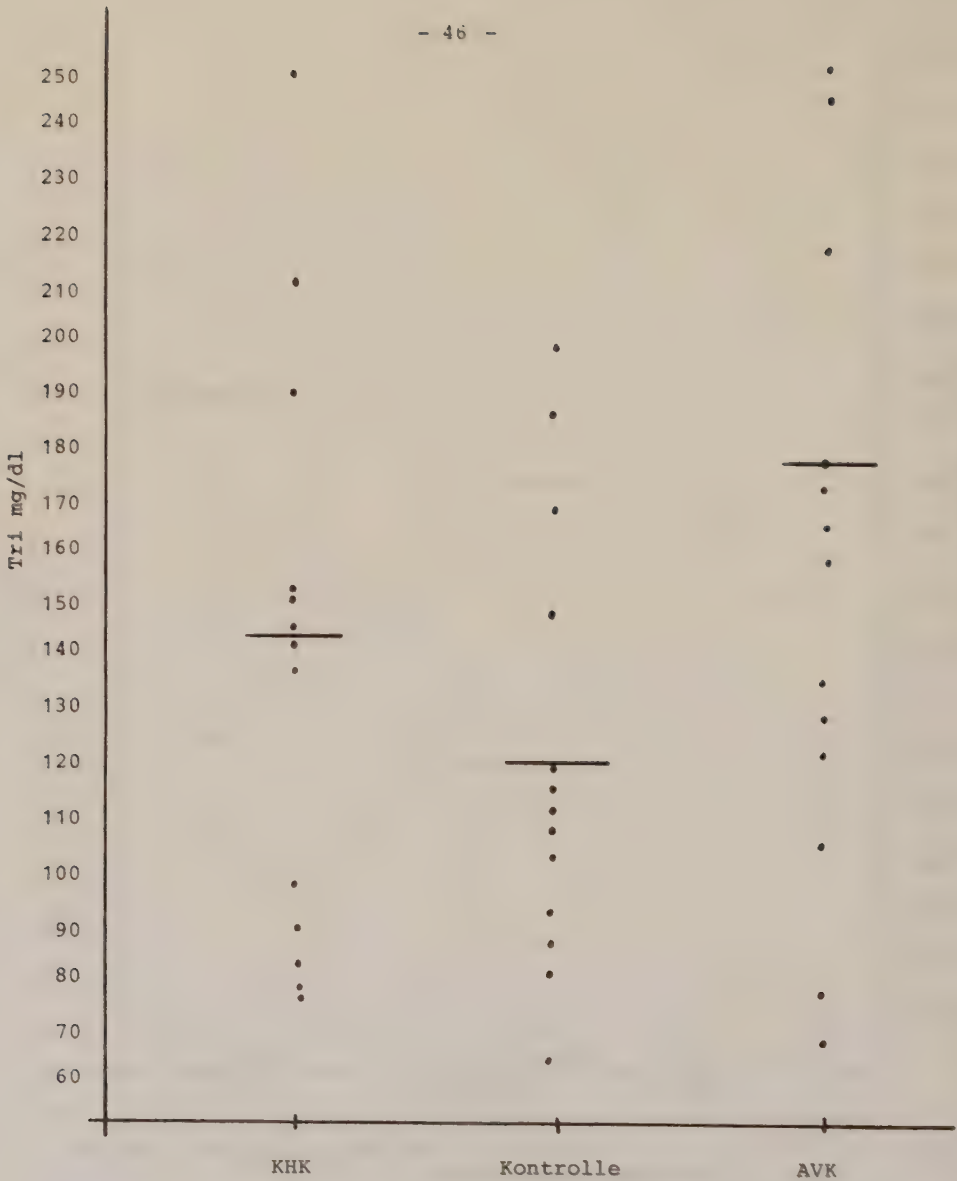


Abb. 6: Vergleich der Serumtriglyzeridspiegel unter den 3 Gruppen
Einzel- und Durchschnittswerte

Legende: Tri = Triglyzeride (mg/dl)

KHK = Koronare Herzkrankheit

AVK = Arterielle Verschußkrankheit

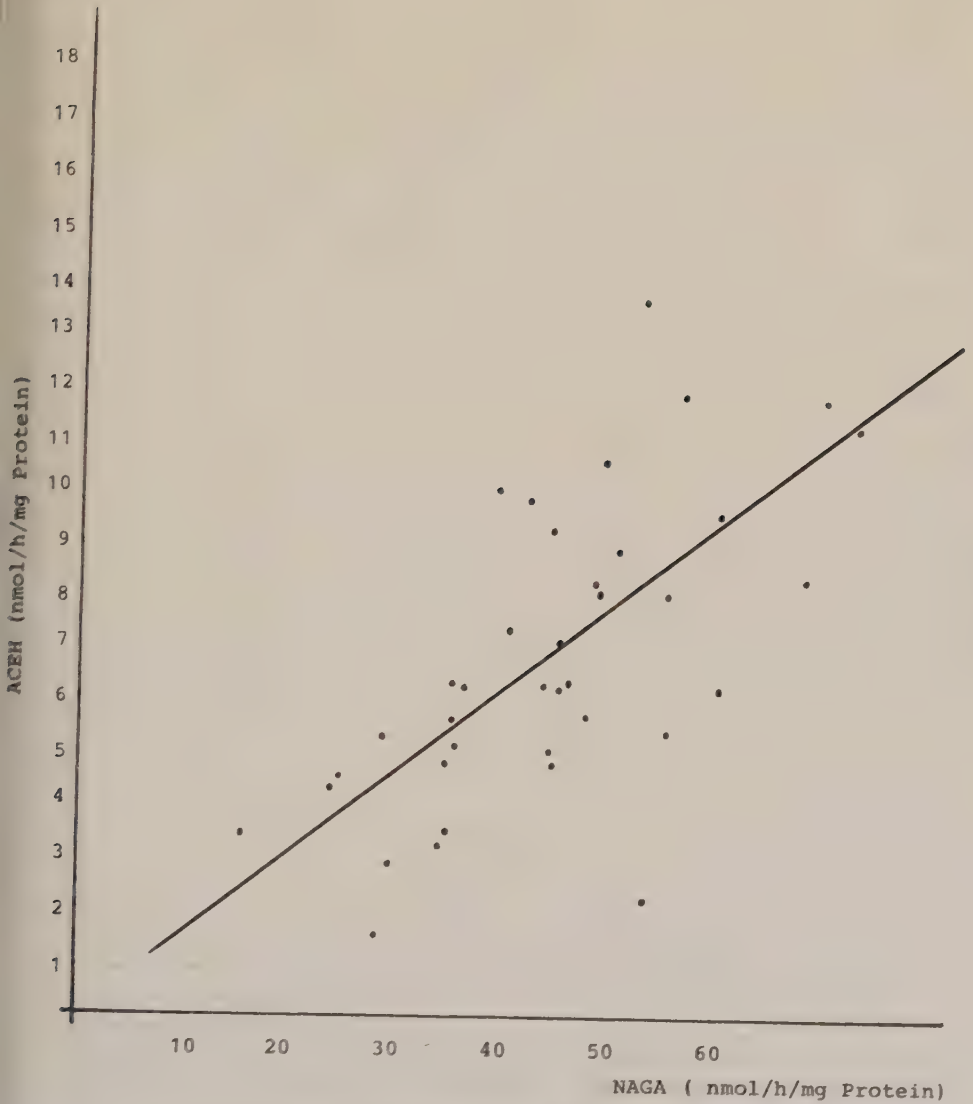


Abb. 7: Korrelation zwischen ACEH und NAGA des gesamten Patientenguts

Legende: NAGA = N-Azetyl- β -D-Glucosaminidase (nmol/h/mg Protein)

ACEH = Saure Cholesterylester-Hydrolase (nmol/h/mg Protein)

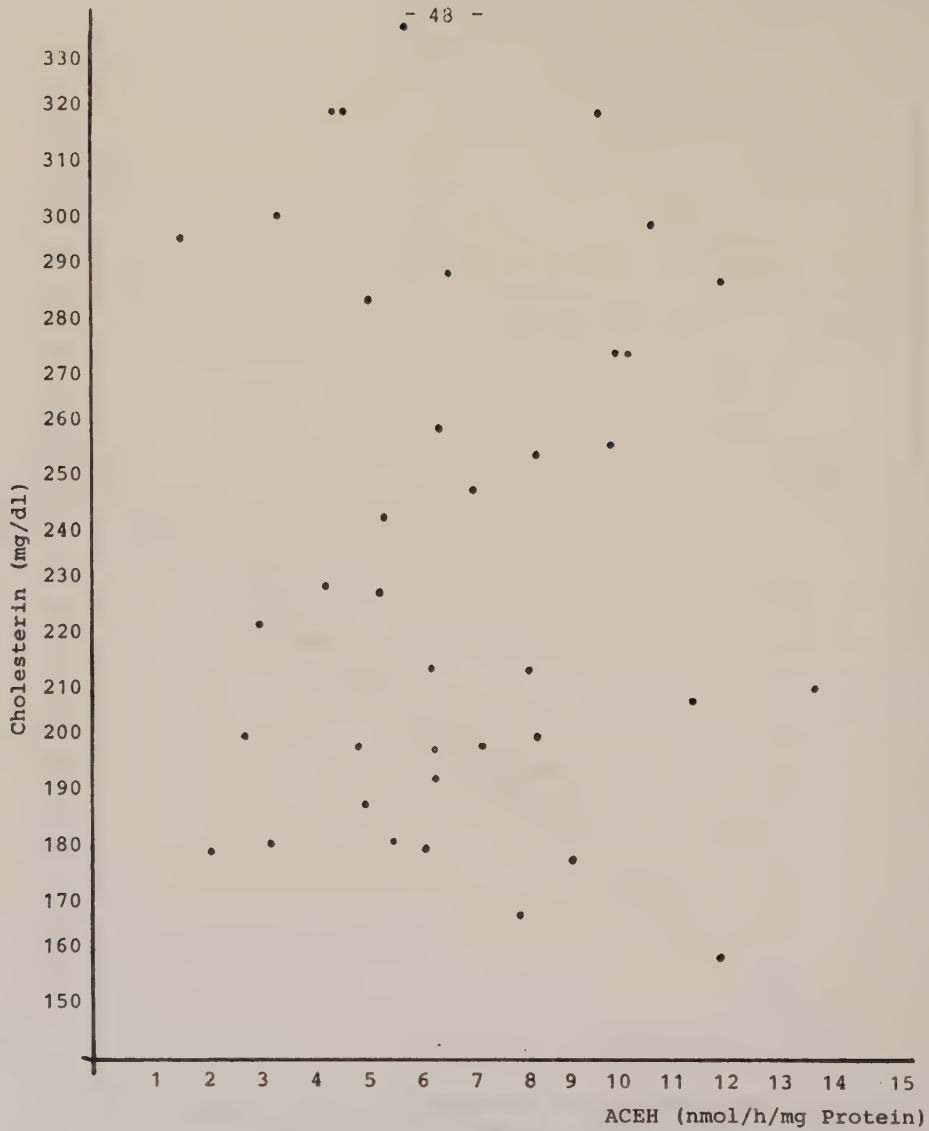


Abb. 8: Korrelation zwischen ACEH und Cholesterin des gesamten Patientenguts

Legende: ACEH = Saure Cholesterylester-Hydrolase (nmol/h/mg Protein)
Chol = Cholesterin (mg/dl)

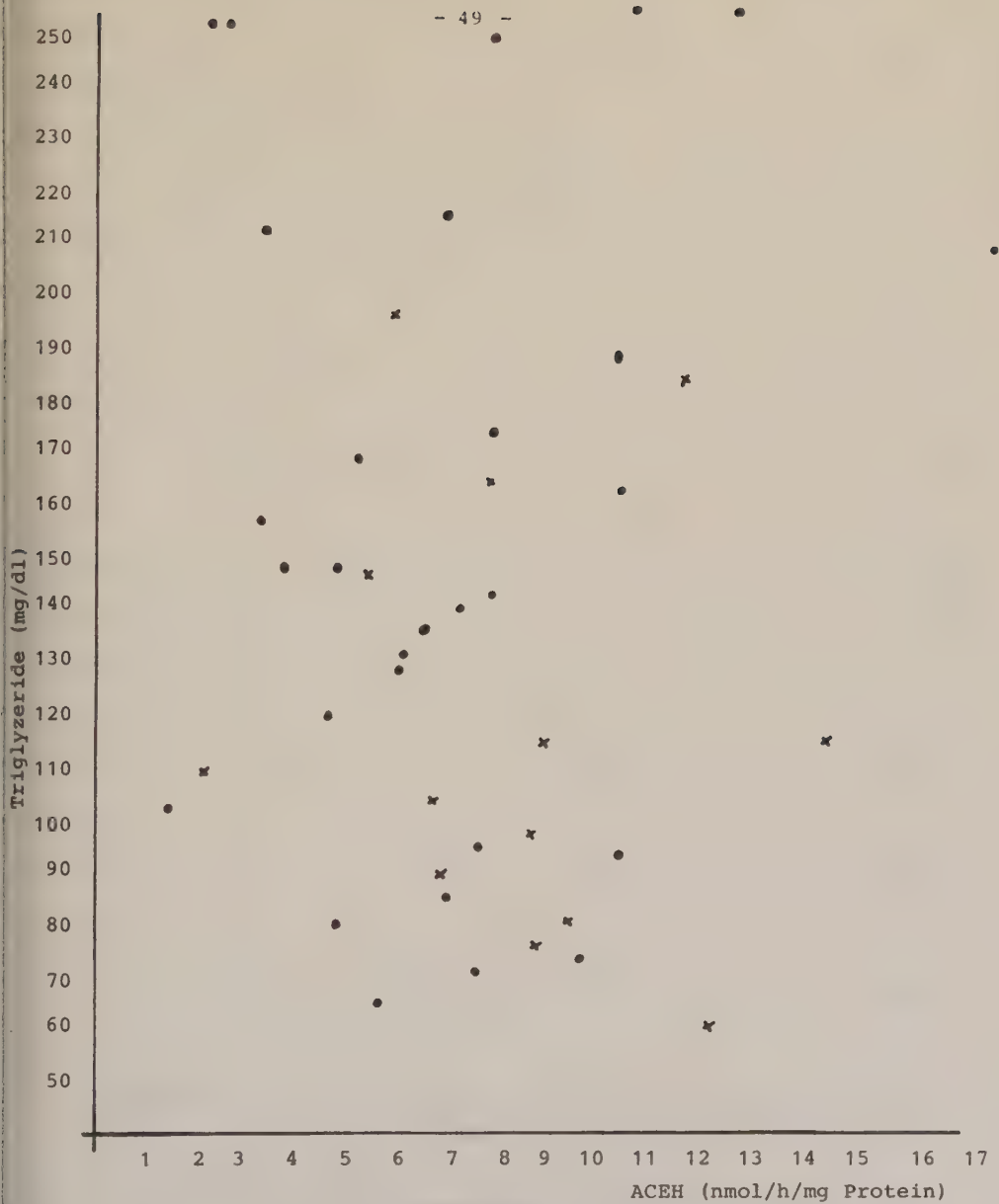


Abb. 9: Korrelation zwischen ACEH und
Triglyzeridwerten des gesamten Patientenguts

Legende: ACEH = Saure Cholesterylester-Hydrolase (nmol/h/mg Protein)
Tri = Triglyzeride (mg/dl)

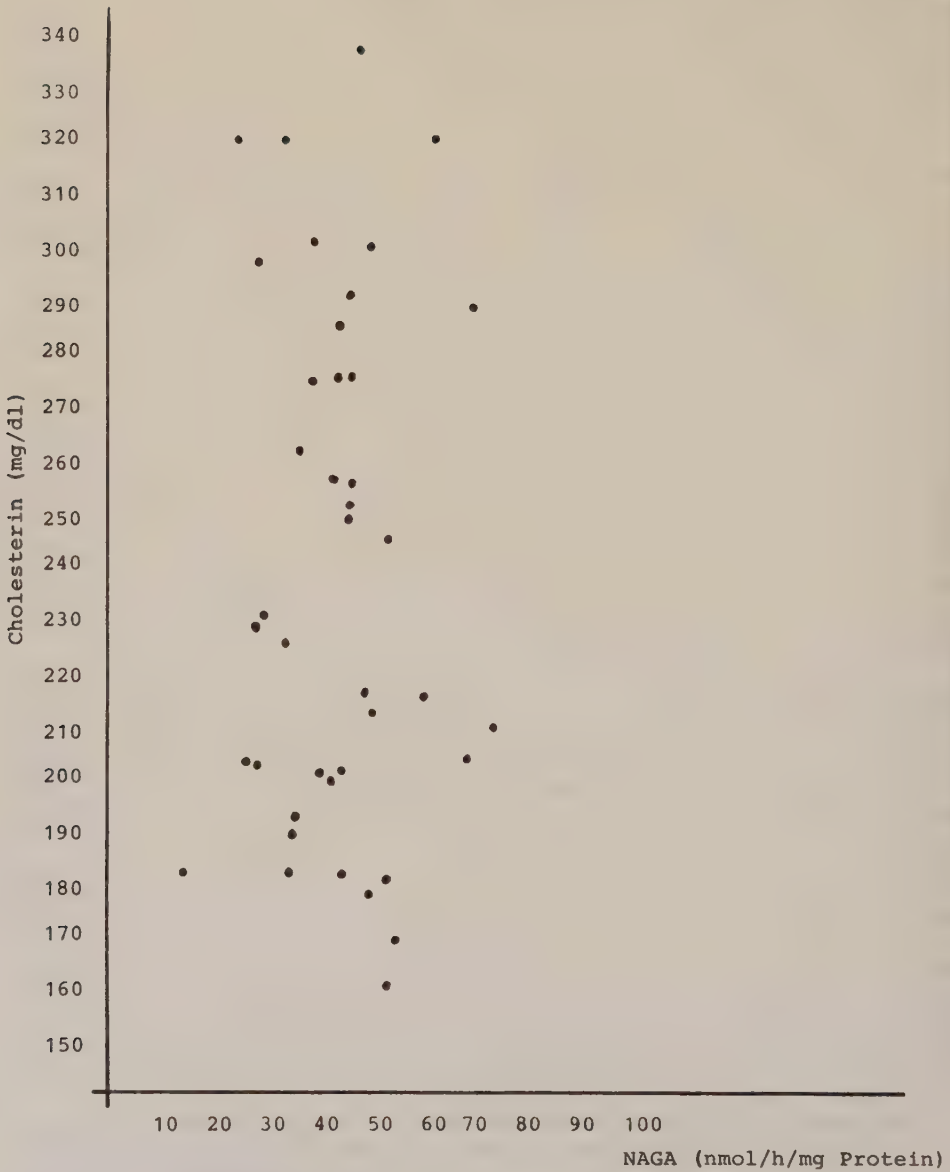


Abb. 10: Korrelation zwischen NAGA und Cholesterinwerten des gesamten Patientenguts

Legende: NAGA = N-Azetyl- β -D-Glucosaminidase (nmol/h/mg Protein)
Chol = Cholesterin (mg/dl)

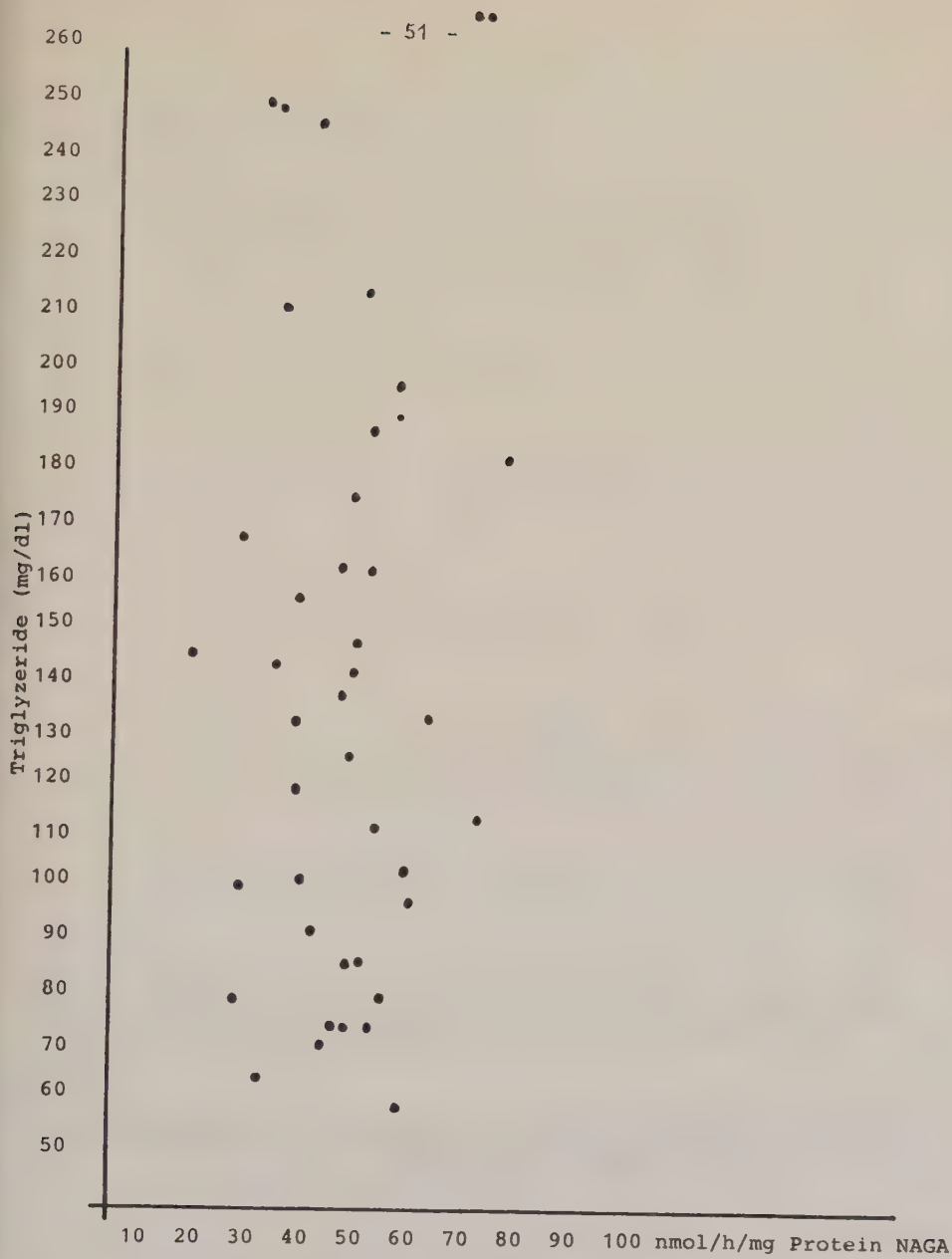


Abb. 11: Korrelation zwischen NAGA und Triglyzeridwerten des gesamten Patientenguts

Legende: NAGA = N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (nmol/h/mg Protein)
Tri = Triglyzeride (mg/dl)

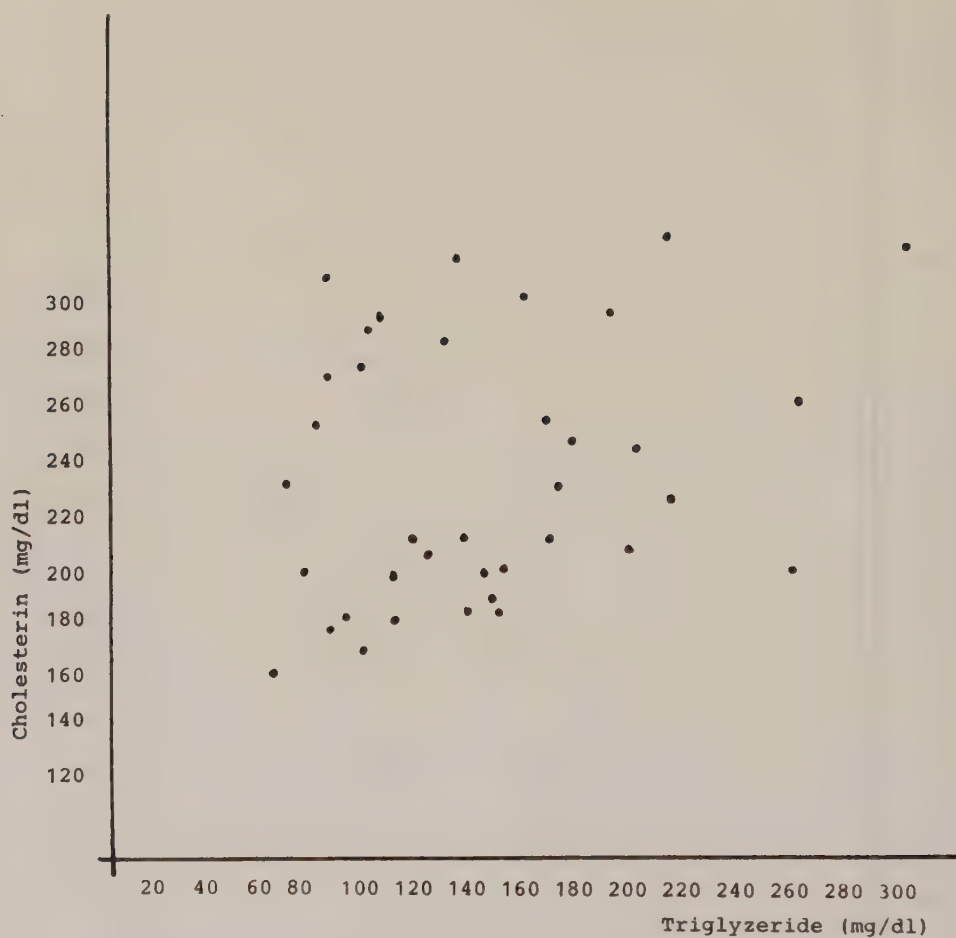


Abb. 12: Korrelation zwischen Serumcholesterin und Serumtriglyceriden des gesamten Patientenguts

Legende: Tri = Triglyzeride (mg/dl)
Chol = Cholesterin (mg/dl)

Literaturverzeichnis

1. Alam, S., K. Solen, D. Layman, M. Riddle, W. Connor:
The mass uptake of cholesterol ester from low density
lipoproteins by cultured smooth muscle and adventitial
cells by human aortas. Circ. Res. 47 (1980) 374
2. Aoki, A., F. Massas:
Cell Tis. Res. 165 (1975) 49
3. Assmann, G.:
Lipidstoffwechsel und Atherosklerose.
Schattauer Verlag, Stuttgart 1982
4. Assmann, G., H. Schriewer: Role of low-density and
high-density lipoproteins in atherogenesis.
Nutr.Metab. 24, Suppl. 1 (1980) 1
5. Barboriak, J.J., A.J. Anderson, A.A. Rimm, J.F. King:
High density lipoprotein cholesterol and coronary artery
occlusion. Metabolism 28 (1979) 735
6. Benditt, E.P.: Implications of the monoclonal character
of human atherosclerotic plaques. Am.J.Pathol 86 (1977)
693
7. Benditt, E.P., J.M. Benditt: Evidence for a monoclonal
origin of human atherosclerotic plaques. Proc.Natl.Acad.
Sci. USA 70 (1973) 1753
8. Böttiger, L.E., L.A. Carlson: Risk factors for ischaemic
vascular death for men in the Stockholm Prospective Study.
Atherosclerosis 36 (1980) 389

9. Boyüm, A.:
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.
Scand.J.Clin.Invest. 58 (1976) 1465
10. Brecher, P., Hae Yung Pyun, A.V. Chobanian:
Effect of atherosclerosis on lysosomal cholesterol esterase activity in rabbit aorta.
J.Lip.Res. 18 (1977) 154
11. Brown, M.S., J.L. Goldstein:
Receptor-mediated endocytosis: Insights from the lipoprotein receptor system.
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76 (1979) 3330, cell biology
12. Brown, M.S., P.T. Kovanen, J.L. Goldstein:
Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. Science (Washington) 212 (1981) 628
13. Buchwald, H., R.B. Moore, R.L. Varco:
Partial ileal bypass: A test of the lipid-atherosclerosis hypothesis. In: Atherosclerosis V. Gotto, A.M., Jr., L.C. Smith, B. Allen (Hrsg.). Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin 1979, 462
14. Cabin, H.S., W.C. Roberts:
Quantification of amounts of coronary arterial narrowing in patients with types II and IV hyperlipoproteinemia and in those with known normal lipoprotein patterns.
Am.Heart J. 101 (1981) 52

15. Carlson, L.A., L.E. Böttiger:
Ischaemic heart disease in relation to fasting values
of plasma triglycerides and cholesterol. Stockholm
Prospective Study.
Lancet I (1972) 865
16. Carlson, L.A., L.E. Böttiger, P.E. Ahfeld:
Risk factors for myocardial infarction in the Stockholm
Prospective Study.
Acta Med.Scand. 206 (1979) 351
17. Castelli, W.P., J.T. Doyle, T. Gordon, C.G. Hames,
M.C. Hjortland, S.B. Hully, A. Kagan, W.J. Zukel:
HDL cholesterol and other lipids in coronary heart
disease. The cooperative lipoprotein phenotyping
study.
Circulation 55 (1977) 767
18. Dean, R.T.:
Direct evidence of importance of lysosomes in degradation
of intracellular proteins.
Nature 257 (1975) 414
19. De Duve, C.:
The participation of lysosomes in the transformation of
smooth muscle cells to foamy cells in the aorta of
cholesterol-fed rabbits.
Acta Cardiol. 20 (Suppl.) (1974) 9
20. Doerr, W.:
Arteriosclerosis without end. Principles of pathogenesis
and an attempt at a nosological classification.
Virchows Arch. A (Path.Anat.) 380 (1978) 91

21. Eigene Schätzungen nach Angaben
 - a) Verband Deutscher Rentenversicherungsträger, Frankfurt am Main, Statistik Band 52
 - b) Bundesarbeitsblatt 3/79
 - c) Statistisches Jahrbuch 1980. Hrsg. Statistisches Bundesamt Wiesbaden, Verlag: W.Kohlhammer, Stuttgart und Mainz, 1980
22. Epstein, F.H.:

Estimating the effectiveness of preventive measures to reduce coronary heart disease risk. In: International Conference on Atherosclerosis. Carlson, L.A. et al. (Hrsg.), Raven Press, New York 1978, 351
23. Epstein, F.H.:

Die Lipidtheorie: Epidemiologische Evidenz. Therapeutische Umschau 37 (1980) 947
24. Fowler, S., H. Shio, H. Wolinsky:

Subcellular fractionation and morphology of calf aortic smooth muscle cells.
J.Cell Biol. 75 (1977) 166
25. Gerrity, R.G.:

The role of the monocyte in atherogenesis.
Am.J.Pathol. 103 (1981) 181
26. Goldstein, J., M. Brown:

Familial hypercholesterolemia. A genetic regulatory defect in cholesterol metabolism.
Am.J.Med. 58 (1975) 147
27. Gordon, T., W.P. Castelli, M.C. Hjortland, W.B. Kannel, T.R. Dawber:

Diabetes, blood lipids and the role of obesity in coronary heart disease risk for women. Ann.Int.Med. 87 (1977) 393

28. Gotto, A.M., G.A. Gorry, J.R. Thompson, J.S. Cole,
R. Trost, D. Yeshurun, M.E. de Baey:
Relationship between plasma lipid concentrations and
coronary artery disease in 496 patients.
Circulation 56 (1977) 875
29. Hafiez, A., A. Bartke:
J.Endocrinol. 52 (1972) 3421
30. Hagemenas, F.C., L.C. Manaugh, D.R. Illingworth,
E.E. Sundberg, F.M. Yatsu:
Cholesteryl ester hydrolase activity in mononuclear
cells from patients with type II hypercholesterolemia.
Atherosklerosis 50 (1984) 344
31. Haley, N.J., H. Shio, S. Fowler:
Characterization of lipid-laden aortic cells from
cholesterol fed rabbits..
I Resolution of aortic cell population by metrizamide
density gradient centrifugation.
C.invest. 37 (1977) 287
32. Harper, H., G. Löffler, P. Petrides, L. Weiß:
Physiologische Chemie.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1975
33. Hauss, W.H.:
Pathogenese und medikamentöse Therapie der Koronarin-
suffizienz.
Internist.Prax. 22 (1982) 15
34. Hauss, W.H.:
Über die Rolle des Mesenchyms in der Genese der Arte-
riosklerose.
Virchows Archiv Abt. A, Path.Anat. 359 (1973) 135

35. Henze, K., A. Chait:
Use of circulating mononuclear cells to study the effect of metabolic changes on lysosomal enzyme activities and low density lipoprotein receptors: Effect of insulin therapy in diabetic patients. Diabetologia 20 (1981) 625
36. Heyden S., G. Heiss, A. Bartel, C.G. Hames:
Fasting triglycerides as predictors of total and CHD mortality in Evans County, Georgia. J.Chron.Dis. 33 (1980) 275
37. Ho, J.R., M.S. Brown, D.W. Bilheimer, J. Goldstein:
Regulation of LDL-lipoprotein receptor activity in freshly isolated lymphocytes. J.clin.invest.58 (1976) 1465
38. Kannel, W.B., W.P. Castelli, T. Gordon:
Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspective based on Framingham study. Ann.Intern.Med. 90 (1979) 85
39. Kannel, W.B., P. Sorlie, F. Brand, W.P. Castelli, P.M. McNamara, G.J. Gherardi:
Epidemiology of coronary atherosclerosis: Postmortem vs. clinical risk factor correlations. The Framingham study. Atherosclerosis V, ed. by Gotto, A.M. jr., L.C. Smith, B. Allan. Springer-Verlag, Berlin 1980
40. Katz-Feigenbaum, D., L. Braun, H. Wolinsky:
Hydrolase activities in the rat aorta. V. Comparison to activities in liver and kidney after thyroidectomy and relation to dynamic clearance of circulating low density lipoproteins. Circ.Res. 49 (1981) 733

41. Kritschewsky, D., H.V. Kothari:
Arterial enzymes of cholesteryl ester metabolism.
Adv.Lipid Res. 16 (1978) 221

42. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, J.R. Randall:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J.Biol.Chem. 193 (1951) 265

43. Miller, N.E., O.H. Forde, D.S. Thelle, O.D. Mjos:
The Tromso heart study. High density lipoproteins and
coronary heart disease: A prospective case-control-
study.
Lancet I (1977) 965

44. Oliver, M.:
Sex differences in pathogenesis and treatment of
occlusive arterial disease.
J.B. Lippincott Co., Philadelphia 1969, p. 124

45. Pearson, T.A., B.H. Bulkley, S.C. Achuff, P.O.
Kniterovich, L. Gordis:
The association of low levels of HDL cholesterol and
arteriographically defined coronary artery disease.
Am.J.Epidemiol. 109 (1979) 285

46. Pelkonen, R., E.A. Nikkilä, S. Koskinen, K. Penttinen,
S. Sarna:
Association of serum lipids and obesity with cardio-
vascular mortality.
Brit.Med.J. 2 (1977) 1185

47. Peters, T.J., M. Müller, C.de Duve:
Lysosomes of the arterial wall. I. Isolation and sub-
cellular fractionation of cells from normal rabbit
aorta.
J.Exp.Med. 136 (1972) 1117

48. Ravi Subbiah, M.T., B.A. Dicke, B.A. Kottke, I.A. Carlo, D.M. Dinh:
Regression of naturally occurring atherosklerotic lesions in pigeon aorta by intestinal bypass surgery.
Atherosklerosis 31 (1978) 117
49. Rhoads, G.G., C.L. Gulbrandsen, A. Kagan:
Serum lipoproteins and coronary heart disease in a population study of Hawaiian Japanese men.
N.Engl.J.Med. 294 (1976) 293
50. Riddle, M., W. Fujimoto, R. Ross:
Biochim.Biophys.Acta 488 (1975) 359
51. Ross, R., J.A. Glomset:
Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell.
Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis.
Science 180 (1973) 1332
52. Severson, D.L., T. Fletcher:
Effect of thyroid hormones on acid cholesterol ester hydrolase activity in rat liver, heart and epididymal fat pads.
Biochim.Biophys.Acta 676 (1981) 256
53. Shio, H., N.J. Haley, S. Fowler:
Characterization of lipid-laden aortic-cells from cholesterol feed rabbits.
II. Morphometric analysis of lipid filled lysosomes and lipid droplets in aortic cell population.
Lab.invest., in press

54. Sloan, H.R., D.S. Fredrickson:
Enzyme deficiency in cholesteryl ester storage disease.
J.Clin.Invest. 51 (1972) 1923
55. Smith, E.B., R.S. Slater:
Relationship between low-density lipoprotein in aortic
intima and serum lipid levels.
Lancet I (1972) 463
56. Stamler, J., M. Best, J. Turner:
Progr.Cardiovas.Dis. 6 (1963) 220
57. Statistisches Jahrbuch, Fachserie 12 (Gesundheitswe-
sen), Reihe 4 (Todesursachen).
Hrsg.: Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, Verlag W.
Kohlhammer, Stuttgart, Mainz 1980
58. Sykes, M., W.M. Cnoop-Koopmans, P. Julien, A. Angel:
The effects of hypothyroidism, age, and nutrition on
LDL catabolism in the rat.
Metab.Clin.Exp. 30 (1981) 733
59. Takano, T., W.J. Black, T.J. Peters, C.de Duve:
Assay kinetics and lysosomal localization of an acid
cholesteryl esterase in rabbit aortic smooth muscle
cells.
J.Biol.Chem. 249 (1974) 6732
60. Vik, T., K. Try, D.S. Thelle, O.H. Forde:
Tromso heart study: Vitamin D metabolism and myo-
cardial infarction.
Brit.Med.J. 2 (1979) 176

61. Wilhelmsen, L., H. Wedel, G. Tibblin:
Multivariate analysis of risk factors for coronary
heart disease.
Circulation 48 (1973) 950
62. Wolinsky, H., S. Fowler:
Participation of lysosomes in atherosclerosis.
New Engl.J.Med. 299(1978) 1173
63. Wolinsky, H., S. Goldfisher, L. Capron:
Hydrolase activities in the rat aorta. Effects of
diabetes mellitus and insulin treatment.
Circ.Res. 42 (1978) 821
64. Yatsu, F.M., F.C. Hagemenas, L.C. Manaugh,
T. Galambos:
Cholesteryl ester hydrolase activity in human
symptomatic atherosclerosis.
Lipids 15 (12) (1980) 1019
65. Yatsu, F.M., F.C. Hagemenas, L.C. Manaugh, J. Tyson:
The effect of oral contraceptives on mononuclear
cell. Cholesteryl ester hydrolase activity in pre-
menopausal women taking oral contraceptives: Relevance
to atherosclerosis.
Trans.Am.Neurol.Assoc. 103 (1978) 53

Danksagung

Für die Überlassung des Themas,
die anregenden Diskussionen und
stete Unterstützung möchte ich
Herrn Prof. Dr. N. Zöllner,
Herrn Prof. Dr. G. Wolfram und
Herrn Dr. K. Henze
herzlich danken.

Lebenslauf

Michael Stechele, geb. am 25.02.1953 in Ottobeuren/
Unterallgäu als Sohn des Dr. med. Max Stechele und
seiner Ehefrau Emma, geb. Graf.

- | | |
|-------------|---|
| 1955 | Umzug nach Bobingen, Landkreis Augsburg |
| 1959 - 1963 | Volksschule in Bobingen |
| 1963 - 1973 | Besuch des humanistischen Gymnasiums
bei St. Stephan in Augsburg |
| 1973 | Abitur am humanistischen Gymnasium bei
St. Stephan in Augsburg |
| 1973 - 1975 | Wehrdienst als Sanitätsunteroffizier |
| 1975 - 1976 | Tätigkeit als Laborant |
| 1976 - 1978 | Kaufmännische Ausbildung |
| 1978 - 1984 | Studium der Humanmedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität in München |
| 1984 | Approbation zum Arzt |
| Seit 1985 | Assistenzarzt an der I. Chirurgischen
Klinik des Krankenhauszweckverbandes
Augsburg |

